REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

ev. Inst. Med. trop. São Paulo, vol. 3, n.° 4, p. 149-212 ★ Julho/Agôsto, 1961

O caminho certo na terapia da amebíase...

DIANTIL

(Clorbetamida)

Amebicida não-metálico...

de ação intensa...

com doses reduzidas

"Diantil é um amebicida sintético não-metálico que se caracteriza por grande atividade e baixa toxicidade". *E. W. Dennis e D. A. Berberian, Antibiotics & Chemotherapy, 6:554, maio, 1954.*

"O que mais sobreleva notar, no tratamento com Diantil, é sua perfeita tolerância." *D. T. Lucena e R. J. Marques, Revista Brasileira de Medicina, vol. XIII, n.º 11, nov. 1955.*

D 1 1 - 60

Comprimidos contendo 0,5 g de N-(2,4-diclorobenzil)-N-(2-hidroxietil) dicloroacetamida. Caixas de 24

DIANTIL Marca registrada é um produto **WINTHROP**

Distribuidores: The Sydney Ross Co., Av. Rio Branco, 251, 11.º and., Rio de Janeiro

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(4):149-160, julho-agôsto 1961

CDU 576.893.161.13
593.161.13-116

STUDIES ON THE LIFE CYCLE OF *TRYPANOSOMA CONORRHINI*. "IN VITRO" DEVELOPMENT AND MULTIPLICATION OF THE BLOODSTREAM TRYPANOSOMES

Maria Paumgartten DEANE and Leonidas M. DEANE

SUMMARY

Hoping to clarify the life cycle of *Trypanosoma conorrhini* of which reproductive forms have never been encountered in the vertebrate host, the authors tried to infect mammals' cells "in vitro" with the flagellate. Intracellular forms of the parasite were not found, but in the nutrient liquid used for the tissue culture, large trypanosomes, identical with the mature bloodstream form of the species, had developed and were multiplying by binary fission.

In trying to determine the factor, or factors, responsible for this "in vitro" proliferation of the blood trypanosome, the authors made a series of experiments and verified that:

1) The presence of living tissue is not necessary, since the same development occurred when only the "nutrient medium" (Hanks' saline, lactoalbumin and calf serum) was used, provided the cultures were incubated at 37°C; in such conditions after several days, an almost pure culture of mature and dividing trypanosomes was obtained;

2) If the same "nutrient medium", with or without a tissue substrate, was maintained at 28°C, development of *T. conorrhini* was the same as in the invertebrate and in conventional blood agar media: abundant multiplication in the crithidial stage and production of the small characteristic metacyclic trypanosomes;

3) In blood agar medium incubated at 28°C, the flagellate developed as usual (crithidias and metacyclic trypanosomes), but if the tubes were incubated at 37°C, the cultures died within a short time.

The authors discuss their observation under different aspects, specially the "in vitro" development and multiplication of the bloodstream form in a non cellular medium, and the factors involved, among which temperature seems to be very important.

INTRODUCTION

Under the name of *Crithidia conorrhini*, a flagellate found in the gut of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer) (*Hemiptera, Reduviidae*) was described by DONOVAN, in 1909 [5, apud 11]. Later recognized as a blood parasite of mammals, it was placed in the genus *Trypanosoma*.

The natural host of *Trypanosoma conorrhini* is probably the house rat, *Rattus rattus*, which has been found infected in Java [1] and in Belém, State of Pará (Brazil) [3]. In both cases infection of the rat was detected through the xenodiagnosis method.

Fac. Med. Univ. São Paulo — Dept. Parasitologia (Prof. A. D. F. Amaral) and Inst. Med. Tropical (Prof. C. S. Lacaz).

DEANE, M. P. & DEANE, L. M. — Studies on the life cycle of Trypanosoma conorrhini. **«In vitro» development and multiplication of the bloodstream trypanosomes. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3: 149-160, 1961.**

White rats and mice, guinea-pigs and monkeys have been repeatedly infected in laboratory. Whatever the point of inoculation, trypanosomes soon appear in circulation, but are seldom numerous. Direct detection of the parasite in blood smears is usually possible for only a few days. Nevertheless, positive xenodiagnosis proves that, at least in many cases, infection may last for months [3, 11]. Sub-inoculations have produced very light infections on the first passage and negative results beyond that [11]. Up to now, reproductive forms of the flagellate have not been met with in the organism of vertebrates [3, 4, 9, 11].

On the other hand, infection of the invertebrate host is usually both frequent and heavy with abundant multiplication. *Triatoma rubrofasciata* has an almost world-wide distribution (in coastal areas) and the proportion of specimens found naturally infected in different places has been very high [1, 2, 4, 6, 7, 9, 11].

The above mentioned facts have suggested [2, 11] that the vertebrate host represents a recent and not entirely successful venture of the protozoon, this being apparently unable to reproduce in the new environment. *T. conorrhini* should then be capable of perpetuating itself as a species through direct transmission from bug to bug — a hypothesis that has yet to be proved.

Another interesting feature about *T. conorrhini* is the remarkable difference in size and shape, between the "metacyclic" and the blood trypanosomes. In the insect, the "metacyclic" forms are represented by two types: one, more common, short and stumpy, averaging less than 10 μ (individuals with less than 5 μ being not infrequent), with an inconspicuous undulating membrane and a nucleus that is very often kidney shaped; the other is elongated, measuring from 12 to about 15 μ, with a narrow and slightly wavy undulating membrane and a more rounded nucleus. Both types present a large kinetoplast in a terminal or subterminal position.

If a laboratory animal is inoculated with the intestinal contents of an infected bug, trypanosomes appear in its blood within a few hours. These first, immature trypanosomes look like a stretching-out of the larger and elongated metacyclics. But in smears made 48-72 hours later, one finds practically only large trypanosomes that may reach more than 60 μ in body length (minus the free flagellum), with a long, finely pointed posterior extremity and a broad, conspicuous and wavy undulating membrane. These mature trypanosomes have, in front of the kinetoplast, "a peculiar pot-shaped structure", represented by a halo or a slightly stained area, such as described by MORISHITA [11] (Fig. 1, upper half).

In spite of unsuccessful trials by earlier workers [4, 11], it has been demonstrated that *T. conorrhini* may be easily maintained in artificial media, such as Senekjie's and NNN, inoculated with the bloodstream forms of the parasite [3, 8]. Sub-cultures can be obtained indefinitely if transfers are made each 15^{th}-20^{th} day.

In the culture tubes the parasite reproduces abundantly in the crithidial stage. As the culture ages, multiplication activity lessens and the characteristic metacyclic trypanosomes become ever more frequent (Fig. 1, lower half).

In the blood agar media, therefore, the parasite behaviour is similar to that it has in the digestive tract of the invertebrate host. The end product of the cycle in culture seems to be the "metacyclic" trypanosome which, it is believed, corresponds to the infective stage for the vertebrate. As it is well known this is the rule for digenetic hemoflagellates: in the conventional culture media these parasites do not go through the same stages as in their vertebrate host.

* * *

In an attempt to clarify the life cycle of the very incompletely known trypanosomes of mammals found in Brazil, one of the authors has isolated and is maintaining some strains in laboratory (in animals, and/or culture media, and/or triatomid bugs). Different approaches are tried for the study of these parasites, one of them being the tissue-culture technique. Here, our obvious aim is to check the possibility of the parasites going through an intracellular stage in their normal mammal hosts.

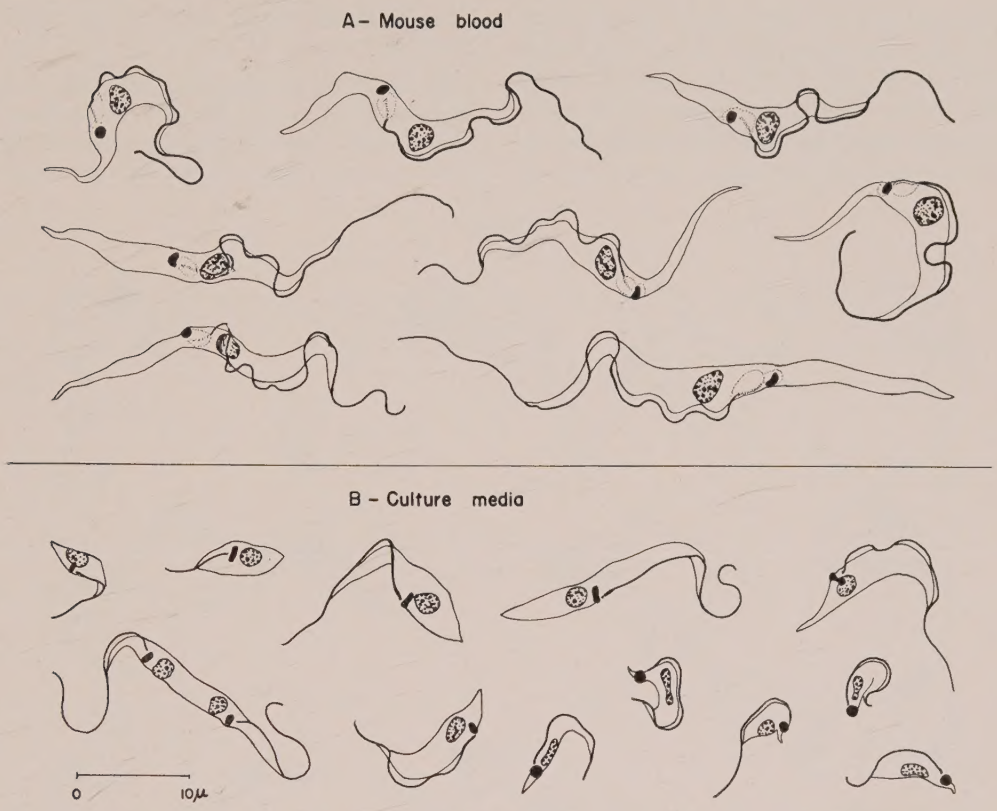


Fig. 1 — *Trypanosoma conorrhini.* Upper half, forms seen in blood of white mice; lower half, forms seen in usual diphasic blood agar media.

The latter method appeared particularly adequate for the study of *T. conorrhini*, since: a) its cycle is in some ways similar to that of *T. cruzi;* b) it seemed unable to multiply in the bloodstream trypanosomose stage; and, c) the previous unsuccessful search for intracellular forms of the parasite in tissues of infected animals could not be taken as definitive proof of the inexistence of such forms.

Our studies on the "in vitro" infection of tissue cultures by *T. conorrhini* led to some unexpected observations which make the subject of this paper.

MATERIAL AND METHODS

The strain of *T. conorrhini* originated from the intestinal contents of a naturally infected specimen of *Triatoma rubrofasciata* caught in the city of Rio de Janeiro. In our laboratory it is being maintained for more than one year in mice, laboratory-bred triatomid bugs, and in blood agar media.

The blood agar medium consists in a modification of the original Nöller's: beef broth — 1,000 ml; peptone — 10 gr; sodium chloride — 5 gr, and agar — 12 gr. The medium is prepared, distributed in tubes, sterilized and mixed with about 10% fresh, defibrinated rabbit blood according to the usual technique.

For the experiments of tissue infection "in vitro" we used a line of monkey heart cells which is being maintained at the Parasitology Department for some time *. Some trials were also made with HeLa cells.

* These cells were first isolated by Salk *et al* in 1954. They were obtained through Dr. R. Piza de Carvalho, of the Microbiology Department, Faculdade de Medicina de São Paulo.

Tissue infection was tried in stationary test tubes with coverglass, to which a transplantation of cells had been made 2-3 days before. This was calculated so as to allow for a reasonable layer of cells on the coverglass (without overgrowth) at the time of infection.

The nutrient medium was made of: Hanks' saline solution (with phenol red as indicator) — 100 ml; enzymatic hydrolysate of lacto-

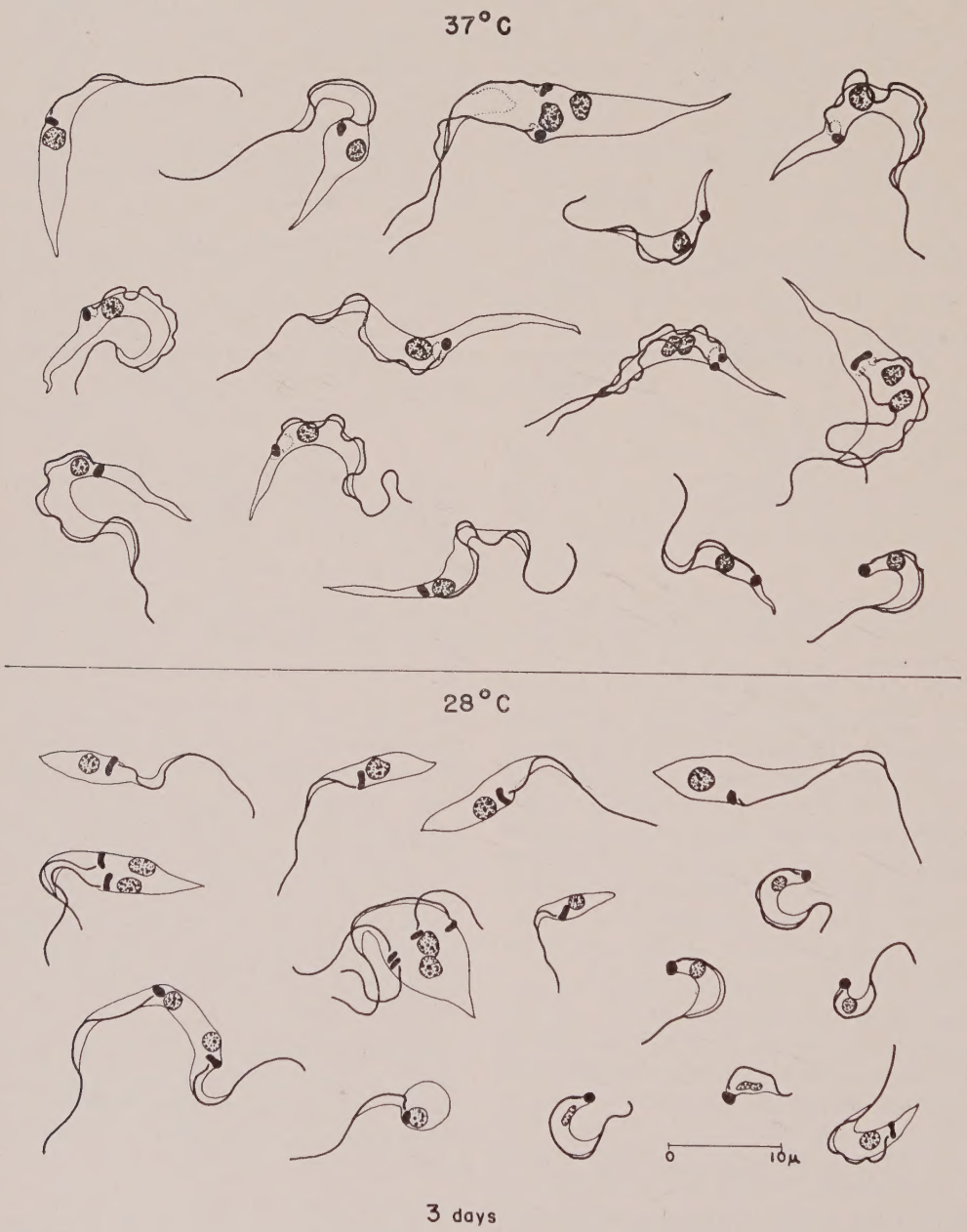


Fig. 2 — *T. conorrhini* in tissue culture nutrient medium (Hanks' saline, lactoalbumin and calf serum), 3 days after inoculation. Upper half, incubated at 37°C; lower half, incubated at 28°C.

albumin (2.5 percent in Hanks' saline) — 10 ml; calf serum — 20 ml.

To infect the cells, slants of 15-20 days old cultures of *T. conorrhini* on blood agar medium were flushed with Hanks' saline, washed twice by centrifugation and the final sediment was resuspended in an amount of clean nutrient medium calculated according to the number of tissue tubes (1.5 ml per tube) to be inoculated. In these tissue tubes the old nutrient medium was then substituted by the new one containing the cultural forms

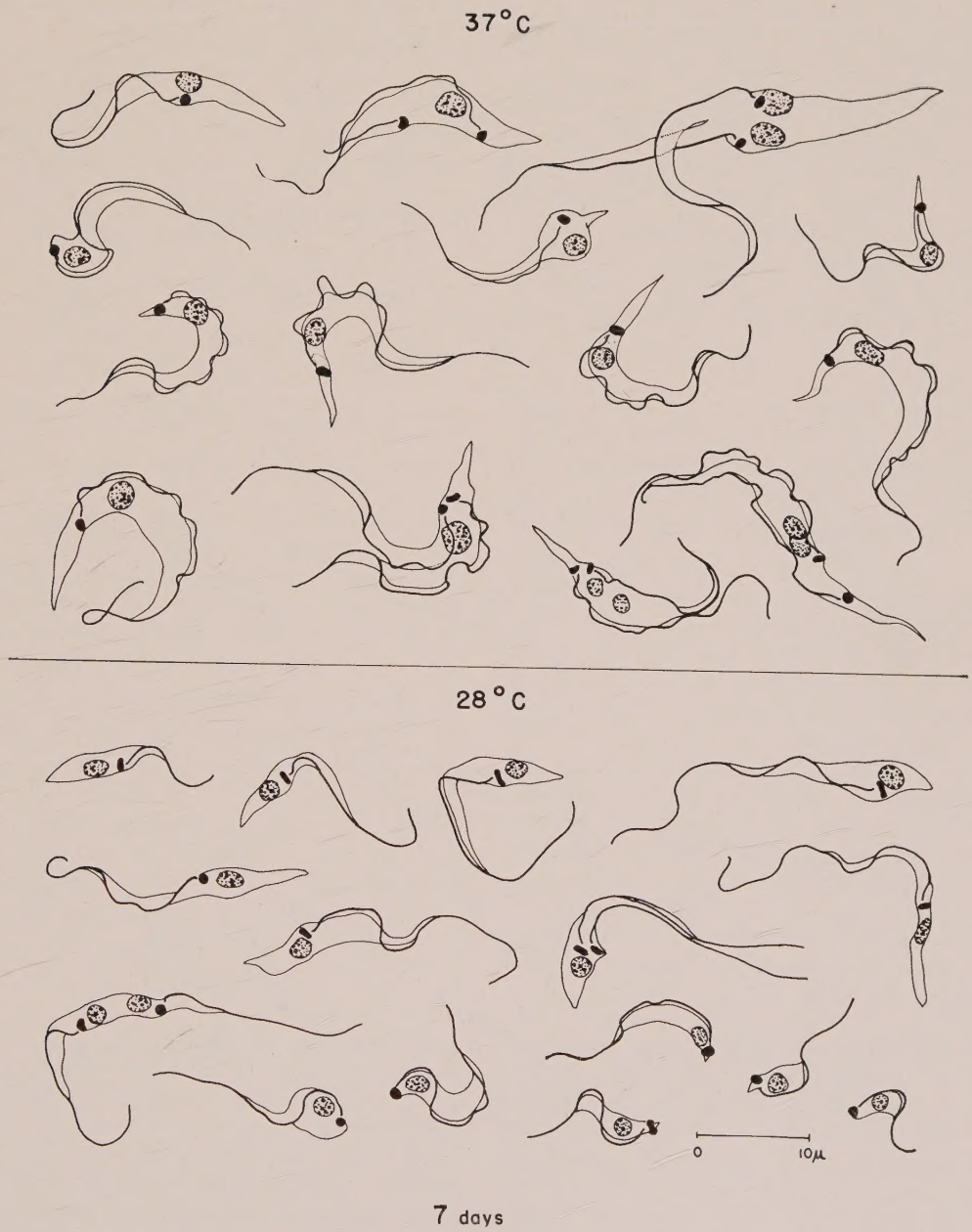


Fig. 3 — *T. conorrhini* in same medium as in Fig. 2, 7 days after inoculation. Upper half, incubated at 37°C; lower half, incubated at 28°C.

of *T. conorrhini*. The tubes were kept at a slanted position in a 37°C incubator.

Each 2nd or 3rd day, according to the fall in pH level, the tissue was refed by substitution of the nutrient medium. In some experiments, the old medium was centrifuged and the sediment resuspended in the new medium, so as to offer the flagellates repeated chances for cellular penetration.

Examinations were made at different intervals, each time in one or two of the

Fig. 4 — *T. conorrhini* in same medium as in Figs. 2 and 3, 12 days after inoculation. Upper half, incubated at 37°C; lower half, incubated at 28°C.

tubes under observation. The coverglass was removed, fixed, stained by Giemsa's and mounted on balsam, for microscopical study. The nutrient medium was centrifuged and the sediment examined in both fresh and stained preparations.

When, in the course of our work, it became evident that we had to test the influence of living cells and of the temperature on the development of *T. conorrhini*, several other experiments were made in which cultural forms of this parasite were inoculated in different groups of tubes, containing:

a) living cells + "nutrient medium", incubated at 37°C;

b) living cells + "nutrient medium", incubated at 28°C;

c) "nutrient medium" incubated at 37°C;

d) "nutrient medium" incubated at 28°C;

e) blood-agar medium incubated at 37°C;

f) blood-agar medium incubated at 28°C.

The above sets of tubes were grouped in different schemes for repeated observations, but the same inoculum was used for all the tubes in each experiment.

The "nutrient medium" was always the same (Hanks' plus lactoalbumin plus calf serum) used for the feeding of monkey heart cells, as already mentioned.

A maximum and minimum thermometer was kept in each incubator and the temperature level was fairly constant throughout the experiments.

RESULTS

We had no evidence of an intracellular stage in the cycle of *T. conorrhini*. The coverglasses examined at various intervals from 18 hours to 11 days after the flagellate had been in contact with the cellular substrate, presented only adherent extracellular forms. Occasionally one isolated leishmanoid parasite was seen within a cell vacuole, and this was interpreted as a phagocytized and degenerating parasite.

However, the liquid phase of the tissue cultures (kept at 37°C) was seen to contain large trypanosomes such as we never encountered in blood agar cultures. They were identical with the bloodstream forms of the parasite and, moreover, some of them were undergoing binary fission.

Aiming to determine the factor, or factors, involved in this "in vitro" development of the mammal stage of *T. conorrhini*, which might or might not be dependent on the presence of living cells, we observed the cycle of the parasite in the various environments previously listed.

It should be emphasized that all experiments were started with the cultural forms of *T. conorrhini* found in 15-20 days old blood agar slants (Fig. 1, lower half).

Results may be thus described:

1) When kept at the same temperature, the tubes containing living tissue supported the development of the same forms of the parasite as did their "controls" which contained the same nutrient medium but no cells.

2) When both above mentioned groups were incubated at 37°C, the sequence of events observed was as follows: a) Within the first 18 hours no quantitative or qualitative modifications were noticeable, except for the appearance of a few trypanosomes resembling the immature bloodstream form. The bulk of the population was made of small or medium-sized, fusiform or pyriform crithidias, extremely active, grouped in great agglomerates and in frequent division. A few longer crithidias and a fair number of "metacyclic" trypanosomes of both the larger and the stumpy types, were seen. b) Between the first and the third days there was a marked fall in population, resulting from mass destruction of the small crithidias and due, probably, to lytic action of the blood serum incorparted in the medium. c) From then on, there was a slow rise in population, this being of a composition entirely different from the initial one. Crithidial organisms were represented almost entirely by the large type with an elongated posterior extremity. Many of them were seen in binary fission, but they seem to

multiply in a slower rythm than the small and medium-sized crithidias previously existing in the cultures. As for the trypanosomes, the "metacyclic" forms completely disappeared, the stumpy type first. Trypanosomes identical with the bloodstream ones became ever more abundant, the smaller or immature form being more frequent at the beginning. After the first week, except for some large crithidias which could still be found, the media contained a pure culture of large, mature, bloodstream type trypanosomes, complete with their "pot-shaped structure". These trypanosomes were often seen in binary division.

Observations were made up to the 18th day, but by the 15th day (or much earlier in the tubes containing living tissue), the cultures began to degenerate.

3) When the same media were kept at 28°C, the cultures were entirely different from the above described. The flagellate population increased steadily due to rapid multiplication of crithidial organisms, specially the small and medium-sized ones which were frequently grouped in large rosettes. Metacyclic trypanosomes of both the stumpy and longer types were common throughout. At about the 10th day some trypanosomes resembling the immature bloodstream form began to appear, but, up to the 18th day of observation they were decidedly less numerous than the "metacyclic". Large, mature bloodstream forms and dividing trypanosomes were never seen.

Degeneration of these cultures maintained at 28°C, specially in the absence of tissue, was much slower than at 37°C.

4) In the diphasic blood-agar medium all the flagellates died within 3-5 days when the tubes were kept at 37°C. It is worth to mention that precautions had been taken against the drying-up of the cultures: Hanks' saline or nutrient broth had been added to increase the liquid phase of the medium and rubber stoppers were used to prevent evaporation.

5) In control diphasic blood-agar media kept at 28°C, development of the parasite proceeded along the path already described. No qualitative difference was noticed between these cultures and those in tubes containing tissue, or with only the liquid phase of the tissue culture and maintained at the same temperature (i.e., 28°C) — except for the mentioned appearance of some immature blood-type trypanosomes in the "nutrient medium". In the blood-agar medium the only trypanosomes seen were of the "metacyclic" types.

Figures 1 to 4 show camera-lucida drawings, on the same scale, of the forms of *T. conorrhini* observed during the present experiments. The accompanying Table gives an idea of the quantitative differences in the incidence of the various developmental stages found in stained smears of tissue culture nutrient medium at different incubation temperatures.

DISCUSSION

Our observations shall be briefly discussed under two aspects:

1) *The life history of* T. conorrhini. Even if we take in consideration the fact that the right cells might not have been used, it seems improbable that the life-cycle of this trypanosome includes an intracellular stage. We have seen that it develops to the mature bloodstream form in the absence of living tissue and that this form is able to reproduce by binary fission.

The fact that dividing trypanosomes have never been found in the blood of vertebrates is probably due to the action of some inhibitory factor that keeps reproduction of the parasite at an extremely low level.

Through the observation of our cultures the impression was gathered that the blood type trypanosome may develop from two different forms, the large crithidia and the longer metacyclic. It seems to us very interesting that not all crithidial organisms are lysed when incubated in the serum saline medium at 37°C, and that the ones which survive are mostly different in size and shape from those that are destroyed. Furthermore, the large surviving crithidias are still able to divide and they may eventually evolve to trypanosomes through posterior migration of the kinetoplast (see drawings, specially

TABLE

Estimation of the quantitative differences in the incidence of developmental stages of *Trypanosoma conorrhini* in tissue culture nutrient medium * incubated at 37°C and 28°C.

Form	At 37°C				At 28°C			
	18 hours	3 days	7 days	12 days	18 hours	3 days	7 days	12 days
Small crithidia	++++++	+	+	—	++++++	++++	++++++	+++
Large crithidia	+	++	+++	+	—	+	+	+
Dividing crithidia	+++	+	++	+	+++	+++	++	++
"Metacyclic" trypanosome, stumpy	++	—	—	—	+++	++	++	+++
"Metacyclic" trypanosome, slender	++	++	—	—	++	+	+	++
Bloodstream type trypanosome, immature	+	+++	++	+	—	—	—	++
Bloodstream type trypanosome, mature	—	++	+++	++++	—	—	—	—
Dividing trypanosome	—	+	++	++	—	—	—	—

* Nutrient medium consisting of Hanks' saline, lactoalbumin and calf serum, and with or without cellular substrate.

on Plate III, upper half). On the other hand, the longer metacyclic trypanosome seems to be able to develop further through great enlargement of its body and stretching of its posterior end.

However, more study is necessary for a better understanding of the relationships and biological significance of these morphological stages of the flagellate.

2) *The "in vitro" propagation of the bloodstream trypanosomes.* The development and reproduction of *T. conorrhini*, was observed to occur in a liquid medium without a cellular substrate and the one factor that appeared to have a preponderant influence upon the phenomenon was temperature.

The influence of temperature on biological phenomena is so widely known that it needs not be discussed here. We only wish to refer, as particularly pertinent, the recent observations by TRAGER [14, 15] on the stimulation of reproductive and infective potentialities of cultural forms of *Trypanosoma vivax*, brought about by modifications in the incubation temperature.

From our experiments with *T. conorrhini*, we think it probable that higher temperature acts indirectly and in two different ways: by allowing or facilitating the lysis of the crithidial stages of the parasite peculiar to the invertebrate host, and by making possible or easier the action of some biochemical factor, or factors, involved in the development and multiplication processes of the trypanosomes.

The observations on which these assumptions are based have been already described but some points should be emphasized. The nutrient medium made of Hanks', lactoalbumin and serum, when incubated at 28°C, allows for some progress in the development of the flagellate towards the bloodstream form, since, after several days, a few immature trypanosomes of this type were found. As we mentioned, however, these trypanosomes did not seem able to develop further if maintained at the same temperature. We may assume then, that the factor, or factors, which would permit progress to full adulthood, is present in this medium but has only partial activity at lower temperatures.

The death of the blood-agar cultures at 37°C might be due both to lethal action of temperature on some stages (e.g. crithidial organisms) of the flagellate and to the absence in the medium of the above mentioned factor, or factors, necessary for the further development of other stages.

In connection with these hypothesis we shall mention the papers by MUNIZ & FREITAS [12, 13] on the "in vitro" development of *Trypanosoma cruzi*. These workers observed the complete vertebrate cycle of *T. cruzi* in a medium consisting of liquid of ascitis artificially produced in guinea-pigs through peritoneal injection of glucose nutrient broth. The medium contained leucocytes and the optimum temperature for the development of the parasite was 37°C. If leucocytes were removed, the metacyclic trypanosomes reverted to leishmanial stage but the cycle was not completed. On the other hand, as stated by the same authors, to start its invertebrate cycle, *T. cruzi* is dependent on two factors, one of which, present in red blood cells, is absorbed by the agar of diphasic media.

There is still much to be learned about the physical and chemical factors involved in the determinism of the life cycles of digenetic flagellates. As far as we are aware, our work with *T. conorrhini* led us to obtain for the first time an almost pure culture of the mature bloodstream form of a mammal trypanosome in a non cellular medium. Further study along these lines might help in the recognition of the above mentioned factors and in the clarifying of the complete life cycle of this and other trypanosomes.

SUMARIO

Estudos sôbre o ciclo evolutivo do Trypanosoma conorrhini. *Crescimento e multiplicação dos tripanosomas sangüícolas "in vitro".*

Para esclarecer o ciclo do *Trypanosoma conorrhini* no hospedeiro vertebrado, no qual não tinham sido até agora encontradas formas reprodutivas do parasito, os autores ten-

taram infectar com êsse flagelado, células de mamíferos cultivadas "in vitro". Verificaram que:

1) o *T. conorrhini* não apresentou formas intracelulares;

2) no líqüido nutriente do cultivo de tecido a 37°C, crescera, ao fim de alguns dias, cultura quase pura de tripanosomas idênticos aos que ocorrem no sangue do hospedeiro vertebrado;

3) nessas condições os tripanosomas se reproduzem por divisão binária;

4) a presença de tecido vivo não é essencial, pois que culturas ricas e com formas idênticas foram também obtidas quando se utilizou apenas o meio nutriente (solução salina de Hanks, lactoalbumina e sôro de vitelo), a 37°C;

5) quando as culturas são conservadas a 28°C, seja contendo tecido vivo, seja contendo apenas o meio nutriente, o desenvolvimento do flagelado se processa de maneira semelhante à que ocorre no tubo digestivo do invertebrado;

6) em meio difásico de agar-sangue, a 28°C, o desenvolvimento corresponde também ao que se passa no invertebrado (como é de regra para os hemoflagelados); se são, entretanto, incubadas a 37°C, as culturas neste meio morrem em pouco tempo.

Tecendo comentários sôbre essas observações, os autores concluem que na fase de tripanosoma sangüícola o *T. conorrhini* tem capacidade de multiplicar-se e que seu desenvolvimento independe de um estágio intracelular. Julgando ser a primeira vez que se obtém em cultura o ciclo sangüícola de um tripanosoma de mamífero, os autores fazem ainda considerações sôbre os possíveis fatôres responsáveis pelo fenômeno. Um dos fatôres que parece ter grande importância é a temperatura de incubação.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our thanks are due to Miss Gilda M. Beltramelli, biologist, for her able technical assistance during these experiments, and to Mr. Archibaldo B. Galvão, entomologist, for providing us with the strain of *T. conorrhini* used in this work.

REFERENCES

1. BONNE, C. — The natural host of *Trypanosoma* (*Crithidia*) *conorrhini* Donovan. Am. J. trop. Med. **17**:393-399, 1937.

2. COSTA, A. L. — Triatomíneos e tripanosomas por êles veiculados em zona central da Cidade do Salvador — Bahia. Tese. Fac. Med. Univ. da Bahia (Brasil). Fundação Gonçalo Moniz ed., 81 pp., 1955.

3. DEANE, M. P. — Ocorrência do *Trypanosoma conorrhini* em "barbeiros" e em rato na cidade de Belém, Pará, e seu cultivo em meio de NNN. Rev. do Serv. especial de Saúde públ. **1**:433-442, 1947.

4. DIAS, E. & SEABRA, C. A. C. — Sôbre o *Trypanosoma conorrhini*, hemoparasito do rato transmitido pelo *Triatoma rubrofasciata*. Presença do vector infectado na cidade do Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **39**:301-329, 1943.

5. DONOVAN, C. — Kala-azar in Madras, specially with regard to its connection with the dog and the bug (Conorhinus). The Lancet **87**:1495-1496, 1909.

6. FLOCH, H. — Sur la présence de *Triatoma rubrofasciata* de Geer et sur son infection naturelle par *T. conorrhini* (Donovan) en Guadeloupe et en Guyane Française. Bull. Soc. Path. exot. **45**:222-227, 1952.

7. FLOCH, H. & ABONNENC, E. — Sur l'identification de *Trypanosoma conorrhini* (Donovan, 1909); sa présence en Guyane Française. Bull. Soc. Path. exot. **42**:221-229, 1949.

8. JOHNSON, E. M. — The cultivation of *Trypanosoma conorrhini*. J. Parasit. **33**:85, 1947.

9. LAFONT, A. — Trypanosome d'un Réduvide (*Conorhinus rubrofasciata*) inoculable au rat et à la souris. An. Inst. Pasteur (Paris) **26**:893-922, 1912.

10. LANGUILLON, J. — Note sur la présence de *Triatoma rubrofasciata* en Guadeloupe et son infection naturelle par *Trypanosoma conorrhini*. Bull. Soc. Path. exot. **44**:316-317, 1951.

11. MORISHITA, K. — An experimental study on the life history and biology of *Trypa-*

nosoma conorhini (Donovan) occurring in the alimentary tract of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer) in Formosa. Jap. J. Zool. **6**:459-546, 1943.

12. MUNIZ, J. & FREITAS, G. — Estudos sôbre o determinismo da transformação das formas sanguicolas do "Schizotrypanum cruzi" em critidias. Rev. brasil. Med. **2**:995-999, 1945.

13. MUNIZ, J. & FREITAS, G. — Realização "in vitro" do ciclo do "S. cruzi" no vertebrado, em meios de caldo-liquido peritoneal. Rev. brasil. Biol. **6**:467-484, 1946.

14. PIPKIN, A. — Avian embryos and tissue culture in the study of parasitic protozoa. II. Protozoa other than *Plasmodium*. Experim. Parasit. **9**:167-203, 1960.

15. TRAGER, W. — Development of *Trypanosoma vivax* to the infective stage in tsetse fly tissue culture. Nature **184**, BA:30-31, 1959.

Recebido para publicação em 20 julho 1961.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(4):161-165, julho-agôsto 1961

CDU 616.992.282:
576.8.077.031:611.778

A REAÇÃO INTRADÉRMICA COM POLISSACÁRIDE DO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*, NA BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA

Celeste Fava Netto [1] e Açucena Raphael [2]

RESUMO

Os autores padronizaram antígeno constituído de polissacáride de *Paracoccidioides brasiliensis* para a realização de reação intradérmica, em pacientes de blastomicose sul-americana e pacientes de outras enfermidades não relacionadas com a blastomicose.

Com antígeno assim padronizado, realizaram reações intradérmicas em 79 pacientes de blastomicose sul-americana, encontrando as seguintes percentagens de positividade: 87% nos pacientes classificados como em bom estado geral; 91% nos de estado geral regular e 67% nos de estado geral mau.

Em inquérito efetuado entre 66 estudantes de medicina, encontraram 20% de resultados positivos; entre 372 pacientes do Hospital das Clínicas com outras enfermidades, encontraram 26% de resultados positivos; entre 44 familiares de pacientes de blastomicose sul-americana, encontraram 66% de resultados positivos.

É discutida pelos autores a importância dos resultados do presente trabalho.

INTRODUÇÃO

A reação intradérmica na blastomicose sul-americana já foi estudada por vários autores, quer na verificação de sua positividade em pacientes portadores da moléstia (Quadro I), quer na realização de inquéritos epidemiológicos (Quadro II).

No entanto, sòmente nos trabalhos de Mackinnon & col.[14], Hounie & Artagaveytia-Allende [11] e Lacaz & col.[13], foi empregado antígeno padronizado (por Mackinnon & col.[14]) em animais experimentalmente infetados.

Reação intradérmica bem padronizada para determinada infecção, pode auxiliar bastante: no diagnóstico, principalmente de certas formas begninas da moléstia; no prognóstico de modo geral, quando interpretada conjuntamente com outros dados imunológicos fornecidos por reações sorológicas; e, ainda, na realização de inquéritos epidemiológicos.

Os motivos acima mencionados, e o conhecimento dos trabalhos de Smith & col.[20] na coccidioidomicose, de Pates [17], de Cross & Howell [5] e de Dyson & Evans [7] na histoplasmose, de Peck & col.[18] na blastomicose norte-americana, todos demonstrando que polissacárides podem ser utilizados como antígenos em reações intradérmicas, nos induziram à realização do presente trabalho.

Fac. Med. Univ. São Paulo, Dept. Microbiologia e Imunologia; Inst. Med. Tropical São Paulo (Prof. C. S. Lacaz).

(1) Assistente do Dept. Microbiol. e Imunol.

(2) Médica auxiliar da Clín. Dermatol. e Sifil.

QUADRO I

Reações intradérmicas em pacientes de blastomicose, segundo diferentes autores.

Autores	Nº de casos	Positividade		Tipo de antígeno
		Nº absoluto	%	
Fonseca Filho & Arêa Leão [10]	2	2	100	Filtrado de cultura em caldo
Basgal [3]	6	6	100	Filtrado de cultura em caldo
Almeida & col.[2]	22	19	86	Paracoccidioidina I (filtrado de cultura em Sabouraud)
Almeida & col.[2]	22	18	82	Paracoccidioidina II (suspensão de células leveduriformes a 1/10)
Almeida & col.[2]	16	10	63	Paracoccidioidina II (suspensão de células leveduriformes a 5%)
Almeida & col.[2]	18	9	50	Paracoccidioidina III (pus ganglionar a 1/10)
Silva [19]	8	8	100	Pus ganglionar a 1/15
Lacaz [12]	18	10	56	Filtrado de cultura em meio de Smith

QUADRO II

Inquéritos epidemiológicos de blastomicose, feitos pela reação intradérmica, por diferentes autores.

Autores	Nº de provas	Positividade (%)	Tipo de antígeno	Local onde se realizou o inquérito
Lacaz [12]	330	7,8	Paracoccidioidina (filtrado puro)	São Paulo
Negroni & col.[15]	64	4,68	Paracoccidioidina (filtrado a 1/10)	Argentina
Mackinnon & col.[14]	537	2,0	Paracoccidioidina (filtrado a 1/10)	Uruguai
Carvalho [4]	475	4,2	Paracoccidioidina (filtrado a 1/10)	Rio de Janeiro
		1,7	Paracoccidioidina (filtrado a 1/100)	
Oliveira [16]	120	3,3	Paracoccidioidina (filtrado a 1/10)	Paraná
Oliveira [16]	110	4,5	Paracoccidioidina (filtrado a 1/10)	Santa Catarina
Hounie & Artagaveytia-Allende [11]	30	0,0	Paracoccidioidina (filtrado a 1/10)	Montevidéu (Uruguai)
Hounie & Artagaveytia-Allende [11]	12	25,0	Paracoccidioidina (filtrado a 1/10)	Soriano (Uruguai)
Hounie & Artagaveytia-Allende [11]	12	41,66	Paracoccidioidina (filtrado a 1/10)	Montes do Rio Negro (Uruguai)
Aguirre [1]	137	0,0	Paracoccidioidina (filtrado)	Chile
Douat & Dias [6]	300	8,0	Paracoccidioidina (filtrado a 1/10)	Rio de Janeiro
Lacaz & col.[13]	529	4,72	Paracoccidioidina (filtrado a 1/10 e 1/100)	São Paulo

MATERIAL E MÉTODO

Antígeno — Utilizamos como antígeno, polissacáride do *Paracoccidioides brasiliensis* isolado e estudado por FAVA NETTO [8, 9]. Na sua padronização, foram empregados 12 pacientes de blastomicose sul-americana e 7 pacientes de outras enfermidades, internados no Hospital das Clínicas. O antígeno, em 3 diferentes diluições (1:5, 1:15 e 1:45) no volume de 0,10 ml, foi injetado por via intradérmica no antebraço dos pacientes. Leituras foram realizadas após 30 minutos, 24 e 48 horas. Verificamos que se tomássemos como critério de positividade a formação de pápula eritematosa de 0,5 cm de diâmetro ou mais, em leitura de 24 horas, obtínhamos 11 resultados positivos nos pacientes de blastomicose sul-americana e nenhum resultado positivo nos pacientes de outras enfermidades, com duas diluições do antígeno (1:5 e 1:15). Escolhemos, então, na realização das provas posteriores, a diluição 1:10 do antígeno (em solução fisiológica) e leitura de 24 horas.

Pacientes — Realizamos reações intradérmicas em 66 estudantes de medicina, em 372 pacientes com doenças não relacionadas à blastomicose sul-americana, em 79 pacientes de blastomicose sul-americana e em 44 familiares de pacientes de blastomicose, que residiam com os mesmos.

RESULTADOS

Nossos resultados encontram-se no Quadro III. No grupo 1, os pacientes de blastomicose sul-americana foram classificados clìnicamente de acôrdo com o estado geral bom, regular e mau. No grupo 2 (doentes com moléstias não relacionadas à blastomicose) discriminou-se a procedência dos pacientes. No grupo 3, apresentam-se os resultados do inquérito epidemiológico em estudantes de medicina e finalmente no grupo 4, o resultado de reações intradérmicas realizadas em familiares dos pacientes de blastomicose.

QUADRO III

Resultados da reação intradérmica com polissacáride do *Paracoccidioides brasiliensis* em diversos grupos de pacientes.

Pessoas submetidas à reação intradérmica	Nº de casos	Resultados positivos	
		Nº	%
1. Pacientes de blastomicose	*79*	*69*	*87*
a) estado geral bom	30	26	87
b) estado geral regular	43	39	91
c) estado geral mau	6	4	67
2. Doentes com moléstias não relacionadas à blastomicose	*372*	*97*	*26*
a) de São Paulo (Interior)	222	65	29
b) de São Paulo (Capital)	35	5	14
c) de outros Estados	103	27	26
d) de outros países	12	—	—
3. Estudantes de medicina	*66*	*13*	*20*
4. Familiares de pacientes de blastomicose	*44*	*29*	*66*
a) espôsas	20	17	85
b) filhos	6	5	83
c) pais	2	2	100
d) mãe	1	1	100
e) irmãos	3	2	67
f) outros parentes	12	2	17

COMENTÁRIOS

Quando utilizamos polissacáride de *Paracoccidioides brasiliensis* como antígeno na realização de provas intradérmicas nos pacientes de blastomicose sul-americana, a percentagem de reações positivas foi da mesma ordem de grandeza que a encontrada por ALMEIDA & col.[2] quando usaram como antígeno a Paracoccidioidina I. Pensamos que 87% de resultados positivos, em pacientes de blastomicose sul-americana, indicam boa sensibilidade para a reação, desde que, é fato conhecido, determinados pacientes reagem negativamente à reação intradérmica, principalmente quando se apresentam em mau estado geral. Ainda não dispomos, na blastomicose sul-americana, de dados que nos permitam saber do valor prognóstico da reação intradérmica, quando interpretada conjuntamente com reações sorológicas, como acontece na coccidioidomicose e na blastomicose norte-americana.

No inquérito epidemiológico, que procedemos em estudantes de medicina e em pacientes portadores de outras enfermidades que não a blastomicose sul-americana, sobressai, de início, o alto número de reações positivas, quando comparamos nossos resultados com os obtidos no Brasil em inquéritos anteriores (Quadro II). No entanto, não acreditamos que êstes resultados não possam representar a realidade, porque resultados positivos em maior percentagem foram obtidos por HOUNIE & ARTAGAVEYTIA-ALLENDE [11] em determinadas regiões do Uruguai. Se considerarmos, ainda, que se possa verificar com a blastomicose sul-americana situação semelhante à encontrada na coccidioidomicose e histoplasmose, onde menos que 1 em 1.000 indivíduos infetados apresenta a doença e se tomarmos em conta o grande número de pacientes com blastomicose-doença em nosso meio, poderemos considerar que a percentagem de resultados positivos por nós encontrada talvez esteja aquém da realidade. Esta maior positividade por nós obtida atribuímo-la à padronização da reação, principalmente à leitura realizada após 24 horas sòmente.

Um segundo fato que se destaca nos resultados dêste inquérito epidemiológico, é que a percentagem de positividade obtida nos pacientes residentes na Capital do Estado, foi pràticamente a metade que a obtida para os pacientes que residiram ou residem no Interior. Êste fato, levando-se em conta a menor oportunidade do residente na Capital, de entrar em contato com as fontes de infecção, sugere, a nosso ver, que a Capital se localiza na zona endêmica de blastomicose sul-americana.

Fato que merece especial destaque são os resultados apresentados no Quadro III, onde a percentagem de positividade da reação intradérmica realizada em familiares dos pacientes, foi pràticamente a mesma que a encontrada nos próprios pacientes de blastomicose sul-americana. A interpretação dêsse fato não nos parece fácil, pois, sabemos que a blastomicose sul-americana, assim como acontece com outras micoses profundas, é considerada não contagiosa. Sabemos, por outro lado, que ocorrem verdadeiras epidemias de histoplasmose em indivíduos que entram em contato com a fonte de infecção na mesma oportunidade. Em certas ocasiões estas epidemias ocorrem nos membros de uma família que por acaso se infetaram ao mesmo tempo. O mesmo fato pode estar implicado na explicação de nossos resultados. No entanto, pensamos que não temos elementos para excluir possível contágio inter-humano. FAVA NETTO [8], após proceder inquérito por reações sorológicas em familiares de pacientes de blastomicose sul-americana, chegou à conclusão que o contágio inter-humano não ficara comprovado, apesar de ter encontrado filho de paciente, doente também êle, de blastomicose.

SUMMARY

Intradermic test with a polysaccharide of Paracoccidioides brasiliensis *in South-American blastomycosis.*

In this work tables are presented showing the researchs previously made in this field and the reasons for this research are discussed.

The authors standardized a polysaccharide from *Paracoccidioides brasiliensis* in patients with South-American blastomycosis and in patients of other illnesses in order to use it, in skin tests.

With this standardized antigen they made skin tests in 79 patients of South-American blastomycosis and found 87% positive reactions in patients that were considered in good physical conditions; 91% positive reactions in patients in regular physical conditions and 67% positive reactions in patients with bad physical conditions.

In an epidemiological survey they found: 20% positive reactions among 66 medical students; 26% positive reactions among 372 patients of other illnesses and 66% positive reactions among 44 relatives of the South-American blastomycosis patients.

The significance of these results is discussed by the authors.

REFERÊNCIAS

1. AGUIRRE, S. P. — Estado actual de la micologia médica en Chile: relatório apresentado à "Reunión de Expertos Latino-americanos en Micologia", Montevidéu, 2-4 março de 1957. Folheto mimeografado.

2. ALMEIDA, F. P.; LACAZ, C. S. & CUNHA, A. C. — Intradermo-reação para o diagnóstico da blastomicose sul-americana (granulomatose paracoccidióidica). Arq. brasil. Med. **35**:267-272, 1945.

3. BASGAL, W. — Contribuição ao estudo das blastomycoses pulmonares. Rio de Janeiro, 1931. Tese Fac. Med. Rio de Janeiro.

4. CARVALHO, A. — Sôbre o emprêgo da paracoccidioidina na cidade do Rio de Janeiro: primeiros resultados baseados no estudo de 475 indivíduos. Rev. brasil. Tuberc. **21**:73-82, 1953.

5. CROSS, F. W. & HOWELL, A. — Studies of fungus antigens. II. Preliminary report on the isolation of an immunologically active polysaccharide from histoplasmin. Pub. Health Rep. **63**:179-183, 1948.

6. DOUAT, N. E. & DIAS, V. M. — Intradermorreações de paracoccidioidina, coccidioidina e histoplasmina: resultados de testes em 300 indivíduos. Rev. brasil. Tuber. **26**: 663-668, 1958.

7. DYSON, J. E. & EVANS, E. E. — Skin test antigens from yeast phase cultures of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*. Univ. Michigan med. Bull. **20**: 53-61, 1954.

8. FAVA *Netto,* C. — Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose sul-americana. São Paulo, 1960. Tese Fac. Med. Univ. São Paulo.

9. FAVA *Netto,* C. — Estudos quantitativos sôbre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. Arq. Cir. clín. & exper. **18**: 197-254, 1955.

10. FONSECA, O. & ARÉA LEÃO, A. E. — Réaction cutanée spécifique avec le filtrat de cultures de *Coccidioides immitis*. Compt. rend. Soc. Biol. **97**:1796-1797, 1927.

11. HOUNIE, P. & ARTAGAVEYTIA-ALLENDE, R. C. — Encuesta sobre la sensibilidade al agente de la blastomicosis sudamericana. An. Fac. Med. Montevideo **42**:27-32, 1957.

12. LACAZ, C. S. — Lesões pulmonares na blastomicose sul-americana: inquérito preliminar com a paracoccidioidina. Hospital, Rio de Janeiro **39**:405-425, 1951.

13. LACAZ, C. S.; PASSOS *fº.*, M. C. R.; FAVA *Netto,* C. & MACARRON, B. — Contribuição para o estudo da blastomicose-infecção: inquérito com a paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico-radiológico dos paracoccidioidino-positivos. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo **1**:245-259, 1959.

14. MACKINNON, J. E.; ARTAGAVEYTIA-ALLENDE, R. C. & ARROYO, L. — Sobre la especificidad de la intradermorreacción con paracoccidioidina. An. Fac. Med. Montevideo **38**:363-382, 1953.

15. NEGRONI, P.; BRIZ de NEGRONI, C.; DAGLIO, C. A.; VIVANCOS, C. & BONATTI, A. — Estudios sobre el *Coccidioides immitis* Rixford et Gilchrist. XII. Cuarta contribución al estudio de la endemia argentina. Rev. argent. Dermatosif. **36**:269-275, 1952.

16. OLIVEIRA, P. P. — Contribuição à geografia da histoplasmina no Brasil. Hospital, Rio de Janeiro **48**:105-112, 1955.

17. PATES, A. L. — Precipitin reaction in experimental histoplasmosis and blastomycosis. Science **108**:383-385, 1948.

18. PECK, R. I.; MARTIN, D. S. & HAUSER, C. R. — Polysaccharides of *Blastomyces dermatitidis*. J. Immunol. **38**:449-455, 1940.

19. SILVA, N. N. — Intradermo-reação para diagnóstico da blastomicose de Lutz. Reunião anual dos Dermatosif. brasil., 2ª, 1945. p. 13-14.

20. SMITH, C. E.; SAITO, M. T.; BEARD, R. R.; KEPP, R. M.; CLARK, R. W. & EDDIE, B. U. — Serological tests in the diagnosis and prognosis of coccidioidomycosis. Amer. J. Hyg. **52**:1-21, 1950.

Recebido para publicação em 6 julho 1961.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(4):166-174, julho-agôsto 1961

CDU 616.993.1-085-092.9

ASSOCIAÇÃO DO AMINONUCLEOSÍDIO DA ESTILOMICINA COM A SULFADIAZINA NA TOXOPLASMOSE EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGO

E. Plessmann Camargo, Maria das Neves R. Carneiro e L. H. Pereira da Silva

RESUMO

Com o objetivo de estudar a associação do aminonucleosídio da Estilomicina com a sulfadiazina na toxoplasmose experimental de camundongo, os autores determinam preliminarmente as doses médias efetivas (DME) de cada droga, empregando injeções subcutâneas cada 6 horas em animais submetidos a uma dieta carente em ácido fólico, ácido p-aminobenzóico e vitamina B_{12}.

Verificam que a DME da sulfadiazina, nas condições referidas, é da ordem de 1/5 da DME da mesma droga, administrada por via oral a animais mantidos em dieta completa balanceada.

Com relação à associação das drogas, obtêm, em alguns níveis de associação, efeitos aditivos com relação à sobrevida dos animais tratados, não podendo, no entanto, demonstrar êsse efeito em têrmos quantitativos, em virtude de variações observadas em outros níveis de associação.

INTRODUÇÃO

Embora a ação da Estilomicina sôbre o *Toxoplasma gondii* seja conhecida desde os trabalhos de Christen & Thiermann [1], apenas recentemente Silva [12] e Silva & Camargo [13] mostraram que a fração aminonucleosídio do antibiótico é a responsável pela sua ação antitoxoplásmica. Embora êstes autores não tenham conseguido demonstrar o mecanismo de ação da droga contra o *Toxoplasma*, tendo falhado as tentativas de reversão da ação da droga em cultura de tecido (Silva [12]), vários elementos, observados em outros sistemas, sugerem que o aminonucleosídio interfere no metabolismo das purinas. Entre êsses elementos temos: a sua analogia estrutural com a desoxiadenosina, seu comprovado efeito na inibição da síntese de nucleotídios purínicos no *Trypanosoma cruzi* (Fernandes & Castellani [4]), sua ação competitiva com o ácido guanílico em *Tetrahymena* (Botle & Oleson apud [10]) e a possibilidade de reversão da ação do antibiótico contra *Trypanosoma equiperdum* pela adenina e outras purinas (Hewitt et al.[9]).

O interêsse do encontro de um antipurínico ativo contra o *Toxoplasma* já foi assinalado por um de nós (Silva [12]). Com efeito, Frenkel & Hitchings [7] mostraram que contra o *Toxoplasma* as drogas ativas, a saber, as sulfonamidas e a pirimetamina, atuam bloqueando a síntese da coenzima transformilante, que é um derivado do ácido fólico. Esta coenzima, como transportadora de formato, é responsável pela introdução dos carbonos 2 e 8 do anel purínico no processo de síntese "de novo" dos ribonucleotídios purínicos (ver Goldthwait et al.[8]). As sulfonamidas e os antifólicos determinam portanto perturbações no metabolismo dos ácidos nucleicos, principalmente na biossíntese "de novo" dos ribonucleotídios purínicos, como, por sinal, já foi amplamente demonstrado pelo bloqueio que determinam na incorporação de glicina C^{14} nos ácidos nu-

Fac. Med. Univ. São Paulo — Dept. Parasitologia (Prof. A. D. F. Amaral).

cleicos e pelo acúmulo de produtos do metabolismo intermediário (ver SKIPPER & BENNETT [14]). O bloqueio desta via pode favorecer ou estimular a outra via de biossíntese — via de salvação — na qual as purinas e pirimidinas pré-formadas são incorporadas diretamente nos nucleotídios e que, por sua vez, pode ser bloqueada pelos antipurínicos. Numerosas bactérias, células animais e mesmo protozoários como o *Trypanosoma cruzi* (FERNANDES & CASTELLANI [3]) são capazes de utilizar ambas as vias de síntese. A utilização concomitante de drogas que atuem nas duas vias de síntese possíveis são teòricamente promissoras. Na prática, vem-se demonstrando que a utilização de antifólicos e antipurínicos, dentro dos referidos critérios, tem levado a resultados muito favoráveis contra bactérias e também em leucemias experimentais.

A demonstração da ação do aminonucleosídio sôbre o *Toxoplasma* sugeriu-nos a sua associação com uma sulfonamida, levando em conta seus prováveis mecanismos de ação.

Entre as sulfonamidas escolhemos a sulfadiazina por ser droga bem estudada na toxoplasmose experimental e por estar bem determinado o mecanismo de ação (FRENKEL & HITCHINGS [7]).

MATERIAL E MÉTODOS

As técnicas de experimentação, bem como as cepas de *Toxoplasma* e camundongos utilizadas foram as mesmas de nosso trabalho anterior (SILVA & CAMARGO [13]). Descrevemos a seguir apenas as particularidades das experiências dêste trabalho.

DIETA — Em algumas experiências foi ministrada aos camundongos a dieta completa balanceada referida em nosso trabalho anterior (SILVA & CAMARGO [13]).

Em outras foi empregada uma dieta carente em ácido fólico, ácido p-aminobenzóico (PABA) e vitamina B_{12}, assim constituída: caseína purificada livre de vitaminas — 25%; óleo de amendoim — 10%; açúcar de cana refinado — 60%; mistura salina de Phillips-Hart — 5%; e mais as seguintes vitaminas em mg por kg de dieta: tiamina — 10; riboflavina — 10; piridoxina — 10; pantotenato de cálcio — 20; biotina — 0,05; nicotinamida — 50; vitamina K — 10; colina — 500; inositol — 100. Além disto foram administradas, semanalmente, em suspensão oleosa *per os*, aos animais submetidos a êste tipo de dieta, 500 unidades de vitamina A, 100 unidades de vitamina D e 1 mg de vitamina E.

Em tôdas as experiências os camundongos começaram a receber a dieta respectiva uma semana antes da inoculação de toxoplasmas.

DROGAS USADAS — A sulfadiazina foi empregada por via oral ou subcutânea, conforme a experiência. As doses por via oral foram calculadas admitindo-se a ingestão de 4 g de alimento por dia por camundongo adulto. Para a via subcutânea usamos a solução aquosa do sal sódico da sulfadiazina, sendo o pH final da solução ajustado em tôrno de 7-8.

O aminonucleosídio da Estilomicina solubilizado em salina foi administrado por via subcutânea.

ESQUEMA DE TRATAMENTO — O tratamento dos animais foi sempre iniciado entre uma a três horas a partir da inoculação de toxoplasmas.

Para estudo dos resultados de associação das drogas, foram determinadas prèviamente as *doses médias efetivas* (DME — dose que, no 10.º dia de tratamento, permite a sobrevida de 50% dos animais inoculados intraperitonealmente com 20.000 toxoplasmas), pelo método gráfico utilizado por EYLES & COLEMAN [2].

A DME foi determinada para cada uma das drogas nas seguintes condições:

Sulfadiazina — a) por via oral, misturada à dieta, seja à dieta balanceada completa, seja à dieta carente em PABA e ácido fólico; b) por via subcutânea em injeções intervaladas de 6 horas, ministrando-se aos animais em experiência dieta carente em PABA e ácido fólico.

Aminonucleosídio — Em injeções subcutâneas, cada 6 horas, em animais submetidos à mesma dieta carente.

QUADRO I

Ação da sulfadiazina sôbre a toxoplasmose experimental de camundongo (cálculo da dose média efetiva em duas diferentes condições de dieta).

— Grupos de 10 camundongos (fêmeas)
— Administração da droga por via oral, misturada na dieta durante 14 dias
— Inóculo: 20.000 toxoplasmas por via intraperitoneal

Grupo	Pêso médio do grupo (g)	mg de sulfa/100 g de dieta		Dose diária (mg/kg/dia*)	Percentagem de camundongos sobreviventes nos dias								
		Dieta completa	Dieta carente		4º	7º	10º	12º	14º	21º	28º	35º	42º
I	23,0	—	16,0	32	100	—	—	—	—	—	—	—	—
II	22,5	—	32,0	64	100	100	100	90	90	80	80	80	80
III	22,8	—	62,5	125	100	100	100	100	100	100	100	100	100
IV	22,4	—	125,0	250	100	100	100	100	100	100	100	100	100
(Contrôle) V	21,7	—	—	—	100	30	—	—	—	—	—	—	—
VI	22,5	16,0	—	32	100	40	10	—	—	—	—	—	—
VII	22,1	32,0	—	64	100	90	80	70	70	40	40	40	40
VIII	23,3	62,5	—	125	100	100	100	100	100	100	90	80	70
IX	24,7	125,0	—	250	100	100	100	100	100	100	100	100	100
(Contrôle) X	21,5	—	—	—	100	—	—	—	—	—	—	—	—

* Dose calculada considerando-se que cada camundongo ingere 4 g de dieta por dia.
DME (dieta completa) = 54 mg/kg de pêso/dia.

A escolha do intervalo de 6 horas entre as injeções foi baseada, para o aminonucleosídio, na curva de concentração sangüínea desta droga determinada por FERNANDES et al.[5] e, para a sulfadiazina, na curva de concentração sangüínea desta droga, por nós determinada segundo a técnica de BRATTON & MARSHALL apud [6].

Nas experiências de associação usamos 160 camundongos fêmeas, distribuídos em grupos de 10, variando entre 18,1 e 18,5 o pêso médio dos grupos. Em 9 dos 16 grupos foram empregadas as nove combinações possíveis entre as doses eqüivalentes a 1, ½ e ¼ da DME de cada droga; 3 grupos receberam apenas sulfadiazina e outros 3 apenas aminonucleosídio em doses equivalentes a 1, ½ e ¼ da DME de cada droga. O grupo restante não foi tratado, tendo servido de contrôle.

As drogas foram administradas em injeções aplicadas uma imediatamente após a outra. Os grupos que receberam apenas uma das drogas receberam outra injeção de solução salina, enquanto o grupo contrôle recebeu duas injeções de salina.

RESULTADOS

I — *Ação da sulfadiazina sôbre a toxoplasmose experimental de camundongos.*

1) *Ação da sulfadiazina por via oral, misturada à dieta* — No Quadro I acham-se resumidos os dados da experiência para determinação das doses médias efetivas da sulfadiazina, via oral e comparação da ação desta droga em duas condições diferentes de dieta, a saber, dieta completa e dieta carente em PABA e ácido fólico. Como se pode notar, nas doses de 64 e 125 mg, por kg de pêso, por dia, houve aparentemente melhor atividade da sulfadiazina administrada em dieta carente. Nos grupos de 32 mg/kg/dia, deu-se o inverso, mas, comparando-se os grupos I e V (contrôle), pode-se ver que os contrôles sobreviveram mais que os tratados, o que de certo modo prejudica os dados de sobrevida do grupo I, uma vez que a dose de sulfa administrada foi seguramente não tóxica. Portanto o resultado do tratamento se nos pareceu melhor, quando a dieta dos animais foi carente em PABA e ácido fólico.

2) *Ação da sulfadiazina por via subcutânea* — a) Determinação das doses por via subcutânea: Na Fig. 1 acha-se expressa a curva da concentração sangüínea da sulfadiazina livre, no sangue de camundongos, após 3 injeções, com intervalos de 8 horas, de 1,25 mg de sulfadiazina cada uma, no volume de 0,2 ml via subcutânea.

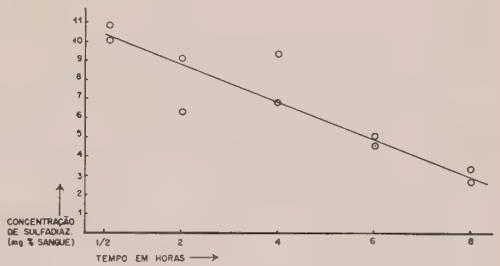


Fig. 1 — Curva de concentração sangüínea da sulfadiazina. Foram feitas 3 injeções subcutâneas de 0,2 ml de solução aquosa do sal sódico de sulfadiazina, contendo 1,25 mg da droga. Injeções intervaladas de 8 horas, sendo o momento da última injeção considerado, no gráfico, como o início dos tempos. (Cada ponto representa um camundongo.)

Pelo resultado das dosagens, pode-se verificar que o nível sangüíneo máximo foi atingido ràpidamente, dentro de 30 minutos a partir da última injeção, caindo, em seguida, à metade dentro de 6 horas e a 1/3 depois de 8 horas. Em vista disto, escolhemos o intervalo de 6 horas para as injeções subcutâneas de sulfadiazina, uma vez que intervalos menores acarretariam, além de prejuízo para os animais por manuseio excessivo, grandes dificuldades de execução.

b) Determinação da DME da sulfadiazina, via subcutânea, em animais submetidos a dieta carente em PABA e ácido fólico: No Quadro II acham-se resumidos os resultados obtidos na determinação da DME da sulfadiazina via subcutânea. O resultado obtido (DME = 10 mg/kg de pêso/dia) coincidiu com a dose mínima empregada, o que prejudica o cálculo gráfico e não oferece grande precisão. Mas, como se pode notar, a administração da droga por via subcutânea a animais em dieta carente faz baixar a sua DME para níveis próximos de 1/5 da DME obtida por via oral, em animais em dieta completa. Por êste motivo,

QUADRO II

Ação da sulfadiazina sôbre a toxoplasmose experimental de camundongo (cálculo da dose média efetiva em condições de carência da dieta para ácido fólico e PABA)

— Grupos de 10 camundongos (fêmeas)

— Administração da droga por via subcutânea cada 6 horas durante 14 dias

— Inóculo: 20.000 toxoplasmas por via intraperitoneal

Grupo	Tratamento	Dose diária (mg/kg de pêso)	Pêso médio em g de pêso	Percentagem de camundongos sobreviventes nos dias								
				4º	7º	10º	12º	14º	21º	28º	35º	42º
I	Sulfadiazina	10	21,6	100	70	50	30	30	10	—	—	—
II	Sulfadiazina	20	21,8	100	100	90	80	70	60	40	30	30
III	Sulfadiazina	40	21,7	100	100	100	90	90	90	90	90	90
IV	Sulfadiazina	80	21,8	100	100	100	100	100	100	100	100	100
V	Nenhum (contrôle)	—	20,9	100	40	—	—	—	—	—	—	—

DME = 10 mg/kg pêso/dia.

preferimos empregar, nas experiências de associação com o aminonucleosídio, a sulfadiazina via subcutânea, adotando igualmente dieta carente em PABA e ácido fólico, para os animais em experiência.

II — *Determinação da DME do aminonucleosídio da Estilomicina.*

Para a associação com a sulfadiazina foi necessário estabelecer, prèviamente, a DME do aminonucleosídio para o tratamento de camundongos mantidos em dieta carente em PABA e ácido fólico. No Quadro III acham-se os resultados desta experiência, ficando determinada a DME como sendo de 27,5 mg/kg de pêso/dia. Embora nossos resultados não tenham permitido determinações exatas das DME do aminonucleosídio e da sulfadiazina, foram suficientes para atender seu objetivo precípuo, ou seja, o de determinar doses que permitissem sobrevida parcial dos camundongos tratados, nos dias considerados, para serem utilizados na experiência de associação.

III — *Associação do aminonucleosídio da Estilomicina com a sulfadiazina na toxoplasmose experimental de camundongo.*

No Quadro IV acham-se reproduzidos os resultados obtidos na experiência de associação do aminonucleosídio com a sulfadiazina, administrados subcutâneamente a camundongos mantidos em dieta carente em PABA e ácido fólico.

As doses das drogas foram calculadas tomando-se como DME, respectivamente, 27,5 mg/kg/dia para o aminonucleosídio e 10 mg/kg/dia para a sulfadiazina (ver Quadros II e III).

QUADRO III

Ação do aminonucleosídio sôbre a toxoplasmose experimental de camundongo (cálculo da dose efetiva média [DME])

— Grupos de 10 camundongos (fêmeas)

— Tratamento com injeções subcutâneas cada 6 horas, durante 14 dias

— Dieta carente em PABA e ácido fólico

— Inóculo: 20.000 toxoplasmas

Grupo	Tratamento	Dose diária (mg/kg de pêso)	Pêso médio do grupo (g)	Percentagem de camundongos sobreviventes nos dias						Sobrevida média (dias)
				4º	7º	10º	12º	14º	21º	
I	Aminonucleosídio	5	21,1	100	10	—	—	—	—	6,7
II	Aminonucleosídio	10	21,0	100	30	—	—	—	—	6,9
III	Aminonucleosídio	20	21,0	100	90	30	10	10	—	9,5
IV	Aminonucleosídio	40	21,4	100	100	90	80	60	—	15,6
V	Nenhum (contrôle)	—	21,0	100	40	—	—	—	—	7,0

DME = 27,5 mg/kg pêso/dia.

QUADRO IV

Tratamento da toxoplasmose experimental de camundongo por associação de sulfadiazina e aminonucleosídio por via subcutânea durante 14 dias cada 6 horas.

— DME empregada para sulfadiazina (10 dias) = 10 mg/kg/dia

— DME empregada para aminonucleosídio (10 dias) = 27,5 mg/kg/dia

— Dieta balanceada carente em ácido fólico e PABA

— Inóculo: 20.000 toxoplasmas por via intraperitoneal

Grupo	Nº de animais	Pêso médio do grupo (g)	Doses (mg/kg/dia)		Percentagem de camundongos sobreviventes nos dias							Sobrevida média (dias)
			Amino-nucleosídio	Sulfa	4º	7º	10º	12º	14º	18º	21º	
I	10	18,3	27,5	10,0	100	100	100	100	70	20	—	16,3
II	10	18,1	27,5	5,0	100	100	100	80	50	10	—	15,1
III	9	18,1	27,5	2,5	100	77	77	66	22	—	—	12,1
IV	10	18,2	27,5	—	100	100	70	60	40	10	—	13,9
V	10	18,4	13,2	10,0	100	90	60	40	20	10	—	11,6
VI	10	18,2	13,2	5,0	100	80	20	10	—	—	—	9,4
VII	10	18,2	13,2	2,5	100	50	—	—	—	—	—	7,7
VIII	9	18,1	13,2	—	100	55	11	—	—	—	—	8,3
IX	10	18,2	6,6	10,0	100	80	40	10	10	—	—	9,6
X	10	18,5	6,6	5,0	100	40	—	—	—	—	—	7,5
XI	10	18,3	6,6	2,5	100	70	10	—	—	—	—	8,1
XII	9	18,5	6,6	—	100	45	—	—	—	—	—	7,7
XIII	10	18,4	—	10,0	100	60	30	10	—	—	—	8,9
XIV	10	18,2	—	5,0	100	30	—	—	—	—	—	6,9
XV	10	18,4	—	2,5	100	20	—	—	—	—	—	6,7
XVI	9	18,5	—	—	100	11	—	—	—	—	—	6,3

Na experiência obteve-se, em alguns níveis de associação, um efeito aditivo dos resultados quimioterápicos, mas a irregularidade observada nas diferentes combinações impediu-nos de analisar êsse efeito aditivo em têrmos quantitativos.

DISCUSSÃO

Como o objetivo principal do presente trabalho foi de estudar o efeito de associação de uma sulfonamida com o aminonucleosídio da Estilomicina não quisemos utilizar a sulfadiazina por via oral, como tem sido feito pelos autores em geral, na toxoplasmose experimental. A variação individual de ingestão de dieta pelos animais não permite avaliar com precisão as doses ministradas, além da anorexia apresentada pelos camundongos no decorrer da infecção falsear a comparação dos resultados em diferentes níveis da droga. Utilizamos, em vista disto, a via subcutânea, estabelecendo o intervalo de 6 horas entre as injeções após determinarmos a curva de concentração sangüínea da sulfadiazina.

Desde que no esquema de associação planejamos utilizar frações da DME e que correspondiam a doses muito baixas de sulfadiazina, lembramos a possibilidade de o PABA e o ácido fólico habitualmente existentes na dieta completa balanceada reverterem o efeito da sulfonamida, prejudicando assim a comparação de efeito de diferentes níveis da droga, possibilidade esta reforçada pela demonstração de SUMMERS [15] e FRENKEL & HITCHINGS [7] de que dietas enriquecidas em PABA e ácido fólico foram capazes de reverterem o efeito da sulfonamida. Por êste motivo resolvemos utilizar a dieta carente em PABA e ácido fólico. E como se pode deduzir dos resultados expressos no Quadro I, em que os camundongos mantidos em dieta carente apresentaram, em média, sobrevida maior que os mantidos em dieta completa, parece mesmo que dietas preparadas com produtos complexos de origem animal e vegetal, como é o caso da dieta completa balanceada habitualmente empregada, contém níveis dessas vitaminas capazes de alterar os resultados do tratamento da toxoplasmose pelas sulfonamidas.

Para a efetivação das experiências de associação determinamos as doses médias efetivas do aminonucleosídio e da sulfadiazina, mas, como se pode notar, os nossos resultados não permitiram a sua determinação precisa pelo método gráfico de LITCHFIELD & WILCOSON [apud 2]. Para os nossos fins, no entanto, as DME obtidas foram satisfatórias, desde que para nós apenas interessava a determinação de doses que permitissem a sobrevida parcial dos camundongos tratados, num período de tempo determinado.

Nas experiências de associação obtivemos uma adição de efeitos quimioterápicos em alguns dos níveis de associação tentados, embora não houvesse a constância necessária dêste efeito para a sua demonstração quantitativa.

Se considerarmos que a sulfadiazina interfere indiretamente com a síntese "de novo" dos purino-nucleotídios e que o aminonucleosídio, como análogo de purina, age provàvelmente no processo de síntese "de salvação" ou na interconversão de nucleotídios purínicos, poderíamos esperar, na presente associação, um efeito sinérgico, pela atuação em vias convergentes de biossíntese (LACEY [11]).

O efeito aditivo observado em nossa experiência ocorre em grande parte das associações de drogas e nada informa quanto a seu mecanismo de ação.

SUMMARY

Association of stylomycin aminonucleoside with sulfadiazine in experimental toxoplasmosis of mice.

Aiming to study the aminonucleoside of stylomycin association with sulfadiazine in experimental toxoplasmosis of mice, the authors establish first of all the *median effective dosage* (MED) of each drug, performing subcutaneous injections every six hours in animals kept in a diet lacking folic acid, p-aminobenzoic acid and vitamina B_{12}.

They verify that the MED of sulfadiazine in such conditions is about 1/5 of the MED of the same drug administered *per os* to animals kept in a balanced diet.

Concerning the association of drugs, they obtain, in some given levels, addictive effects concerning survival of treated animals, but they cannot demonstrate this effect in quantitative terms, for some variations in other levels have been observed.

REFERÊNCIAS

1. CHRISTEN, R. & THIERMANN, I. E. — Quimioterapia experimental de la toxoplasmosis. II. Efecto de la acromicina sobre la toxoplasmosis experimental del ratón. Bol. Inform. parasit. chil. **8**:49-51, 1953.

2. EYLES, D. E. & COLEMAN, N. — Sinergistic effect of sulfadiazine and Daraprin against experimental toxoplasmosis in the mouse. Antibiot. & Chemother. **3**:483-490, 1953.

3. FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. I. Precursors of purine compounds. Exper. Parasitol. **7**:224-235, 1958.

4. FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. II. "In vitro" effect of tioguanine and aminonucleoside of Stylomycin. Exper. Parasitol. **8**:480-485, 1959.

5. FERNANDES, J. F.; PEREIRA, J. P. M. & SILVA, L. H. P. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. IV. Effect of the aminonucleoside of Stylomycin on mouse infection. Exper. Parasitol. **8**:496-501, 1959.

6. FISTER, H. — Manual of standardizing procedures for spectrophotometric chemistry. Standard Scient. Supply Corp., 1950.

7. FRENKEL, J. K. & HITCHINGS, G. H. — Relative reversal by vitamins (p-aminobenzoic acid, folic and folinic acids) of the effects of sulfadiazine and pyrimethamine on *Toxoplasma*, mouse and man. Antibiot. & Chemother. **7**:630-638, 1957.

8. GOLDTHWAIT, D. A.; PEABODY, R. A. & GREENBERG, G. — The biosynthesis of the purine ring. (*In* McELROY, W. D. & GLASS, B., ed. — Amino acids metabolism. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1955. p. 765-781.)

9. HEWITT, R. I.; GUMBLE, A. R.; WALLACE, W. S. & WILLIAMS, J. H. — Experimental chemotherapy of trypanosomiasis. IV. Reversal by purines of the "in vivo" activity of Puromycin and an aminonucleoside analog, against *Trypanosoma equiperdum*. Antibiot. & Chemother. **4**:1222-1227, 1954.

10. HUTCHINGS, B. L. — Puromycin. (*In* WOLSTENHOLME, G. E. W. & O'CONNOR, C. M., ed. — The chemistry and biology of purines. Ciba Foundation Symposium, p. 177-188. London, Churchill, 1957.)

11. LACEY, B. W. — Mechanisms of chemotherapeutic sinergy. (*In* Strategy of chemotherapy, Eighth Symposium of the Society for General Microbiology, p. 247-287, Cambridge, University Press, 1958.)

12. SILVA, L. H. P. — "In vitro" effect of the aminonucleoside of Stylomycin and dimethyl-adenine against *Toxoplasma gondii*. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo **2**:155-162, 1960.

13. SILVA, L. H. P. & CAMARGO, E. P. — Ação de alguns análogos de purina, particularmente o aminonucleosídio da estilomicina, na toxoplasmose experimental de camundongo. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, **3**:121-126, 1961.

14. SKIPPER, H. E. & BENNET Jr., L. L. — Biochemistry of cancer. Ann. Rev. Biochem. **27**:137-166, 1958.

15. SUMMERS, W. A. — The effects of oral administration of aureomycin, sulfathiazole, sulfamerazine and 4,4'-diamino-diphenil sulfone on toxoplasmosis in mice. Am. J. trop. Med. **29**:889-893, 1949.

Recebido para publicação em 18 julho 1961.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(4):175-180, julho-agôsto 1961

CDU 616.993.161-084(812.3)
614.449

PROFILAXIA DO CALAZAR NO CEARÁ, BRASIL

Joaquim Eduardo de ALENCAR [1]

RESUMO

O autor faz uma revisão dos métodos de profilaxia do calazar no Estado do Ceará, detendo-se particularmente na descoberta e tratamento dos casos humanos, descoberta e eliminação dos casos caninos e destruição dos flebótomos domiciliares pela dedetização.

No tratamento de 2.096 casos foram usados os seguintes medicamentos: antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime), hexonato de antimônio (Solustibosan) e a diamidine di-fenoxi-pentana (Lomidine).

Na segunda ordem de medidas, foram examinados, de 1953 a 1960, 279.423 cães, dos quais foram eliminados 78.929.

Na terceira, consta a utilização do DDT na proporção de 1,5 g/m^2 de paredes domiciliares, internas e externas, e abrigos de animais. São comparados dois grupos de 14 Municípios cada; no grupo em que não se fêz a dedetização houve um aumento de 11,9% dos casos no último quatriênio em relação ao primeiro; no grupo em que se fêz a dedetização houve uma redução de 58,2% no número de casos.

INTRODUÇÃO

A profilaxia de uma moléstia parasitária deve ser feita tendo em conta precìpuamente as condições epidemiológicas em que a mesma se desenvolve. Quando são múltiplos os fatôres podemos quebrar a cadeia em vários pontos ao mesmo tempo. Mas, quando êles são conhecidos igualmente, podemos ater-nos apenas a um dos pontos, o mais fácil de ser atacado, ficando livres os demais. Entretanto, não é arbitrária a escolha.

A leishmaniose visceral no Ceará é uma zoonose de canídeos que se transmite eventualmente ao homem; atinge entre nós o cão, como principal reservatório, e um canídeo silvestre, a rapôsa (*Lycalopex vetulus*)[12] . Entretanto a importância do homem como reservatório não é pequena [1, 12].

Do homem, do cão e da rapôsa, a moléstia transmite-se por meio da picada do *Phlebotomus longipalpis* [1, 7, 9, 11, 13, 15].

Tendo em conta êsses fatôres, e mais o fato de serem as condições climáticas e de pauperismo, ou as condições sócio-econômicas em geral, coadjuvantes, teremos na profilaxia meios básicos e meios auxiliares. Os básicos seriam:

a) descoberta e tratamento dos casos humanos;

b) descoberta e eliminação dos casos caninos;

c) descoberta e eliminação de rapôsas infectadas;

d) luta contra o vetor (flebótomo).

Além disso poderíamos acrescentar mais os meios auxiliares:

e) defesa do homem sadio;

f) contrôle dos reservatórios;

(1) Coordenador do Combate à Leishmaniose do Departamento Nacional de Endemias Rurais do Ministério da Saúde. Diretor do Instituto de Medicina Preventiva da Universidade do Ceará.

g) melhoria das condições de vida das populações atingidas.

RESULTADOS DA PROFILAXIA

a) *Descoberta e tratamento dos casos humanos* — Os casos são diagnosticados clìnicamente pelos médicos das regiões afetadas e a confirmação se faz em centros especializados onde os recursos de diagnóstico e a experiência dos técnicos é maior. Com isso foram conhecidos no Ceará, até dezembro de 1960, 2.096 casos, excetuados aquêles diagnosticados *post mortem*, pela viscerotomia. Ano a ano distribuem-se êsses casos, de 1953 a 1960, na seguinte ordem: 140, 356, 424, 308, 263, 189, 203 e 204. Estão excetuados 9 casos conhecidos antes de 1953.

Os doentes têm sido tratados pelo antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime), pelo hexonato de antimônio (Solustibosan)[3], e os casos resistentes aos antimoniais pentavalentes são tratados pelas diamidinas aromáticas (Lomidine).

O primeiro dêsses medicamentos é usado na dose de 0,23 ml para cada quilo de pêso do paciente, por via intramuscular ou endovenosa, diàriamente ou em dias alternados, em 1, 2 ou 3 séries de 10 injeções (700, 1.400 ou 2.100 mg por quilo).

O segundo é aplicado na dose de 0,1 ml para cada quilo de pêso, por via intramuscular, diàriamente, em 10 injeções (50 mg por quilo).

O terceiro é usado na dose de 0,1 ml para cada quilo de pêso, por via intramuscular, em 1 ou 2 séries de 8 injeções (40 e 80 mg por quilo).

b) *Descoberta e eliminação dos casos caninos* — O cão é o principal reservatório da moléstia. Por isso grandes esforços são desenvolvidos com o objetivo de diagnosticar e eliminar os cães infectados. Não podemos pensar em tratamento porque neste caso é ineficaz.

O diagnóstico foi realizado inicialmente pelo exame clínico e parasitológico dos cães das áreas afetadas, considerando-se como tais cem casos em tôrno da casa em que houvesse um caso de calazar humano ou canino. A suspeição clínica era dada pelo encontro de qualquer sinal ou sintoma apresentado pelo cão e o exame parasitológico era feito pelo esfregaço de material retirado do fígado pela técnica de Nicolle e Conor e de linfa dérmica colhida de fragmento da orelha do cão [1].

Posteriormente passamos a utilizar meios mais rigorosos de diagnóstico como é o da fixação de complemento, que permite o encontro de maior número de casos [18].

De 1953 até hoje foram examinados no Ceará 279.423 cães, com o encontro de 3.712 positivos, como vemos no Quadro I.

QUADRO I

Anos	Cães examinados	Cães positivos	Cães eliminados
1953	16	1	1
1954	930	42	42
1955	518	42	42
1956	6.788	109	109
1957	29.856	251	251
1958	49.947	384	14.469
1959	138.923	817	49.821
1960	52.445	2.066	14.194
Total	279.423	3.712	78.929

Até 1959 também eliminamos os cães clìnicamente suspeitos, tendo como certo que o exame parasitológico não encontrava todos os casos, mas em 1960, com a introdução do método de PELLEGRINO & BRENER [23], de fixação de complemento em eluato de sangue dessecado em papel de filtro e a adaptação desta técnica para trabalho de massa, usando sangue da orelha do cão, pudemos examinar sorològicamente uma parte da amostra, ou sejam 25.050 cães, encontrando-se nesse grupo uma positividade muito maior que a pesquisa parasitológica ùnicamente. Com isso haverá a possibilidade de eliminar sòmente os cães parasitológica e sorològicamente positivos.

Assim, do total de 52.445 cães examinados em 1960, 336 eram positivos parasitològicamente; do total foram examinados 25.050 pela fixação do complemento, com o encontro de 1.815 positivos. Releva notar que 1.730 cães foram positivos à sorologia e negativos parasitològicamente. Provàvelmente outra moléstia, talvez a moléstia de Chagas, também esteja presente nestes casos.

c) *Descoberta e eliminação de rapôsas infectadas* — DEANE & DEANE [10], em 1954, encontraram 4 rapôsas (*Lycalopex vetulus*) infectadas, dentre 33 examinadas, no Município de Sobral.

No ano próximo passado, retomamos os trabalhos dêsses autores e examinamos mais 173 rapôsas, com o encontro de 7 infectadas. Em nossas pesquisas encontramos uma incidência menor, mas a amostra foi mais diluída, atingindo vários pontos do Município de Sobral. Pretendemos continuar o trabalho para melhor concluir sôbre êsse problema.

d) *Luta contra o vetor* — Por analogia com o que acontece com a leishmaniose tegumentar americana, a verruga peruana, botão do Oriente [6, 8, 16, 17, 19] e mesmo o calazar, da Índia e da China [20, 21, 22], no Combate à Leishmaniose no Ceará efetuamos a dedetização domiciliária. Usamos o DDT na base de 1,5 g por metro quadrado de parede [14], aplicando-o nas paredes de dentro e fora das casas, até 3 m de altura e também nos abrigos de animais ligados ao domicílio. Com isso em algumas regiões tem diminuído muito a incidência da moléstia humana, mas em outras a redução é mínima. Isso deve-se ao fato de não ser aproveitada em tôdas as regiões a época ótima de aplicação do inseticida, que deverá ser efetuada antes da recrudescência dos flebótomos.

QUADRO II

Casos de calazar humano ocorridos em Municípios não dedetizados no Estado do Ceará

Municípios	Anos	
	1953 a 1956	1957 a 1960
Aracati	10	8
Aracoiaba	2	3
Canindé	6	7
Guaraciaba	4	6
Independência	5	16
Iguatu	5	3
Itapagé	5	12
Limoeiro	11	10
Quixeramobim	9	2
Redenção	4	4
Santa Quitéria	9	15
Tamboril	3	4
Tauá	12	5
Uruburetama	4	6
Totais	89	101
% de aumento ..	—	11,9

Os Quadros II a IV mostram-nos os resultados obtidos. Pelo Quadro II vemos que a redução da doença em localidades dedetizadas várias vêzes e em municípios onde a moléstia apresentava-se com altos índices, é muito grande; de 271 localidades nas quais anteriormente a moléstia fôra assinalada, apenas 111 apresentaram-na depois da dedetização. Em 4 municípios dedetizados 2 a 4 vêzes, no período de 5 anos, conseguiu-se mesmo chegar a zero.

QUADRO III

Casos de calazar humano ocorridos em Municípios dedetizados no Estado do Ceará

Municípios	Anos	
	1953 a 1956	1957 a 1960
Cariré	21	1
Coreaú	62	9
Freicheirinha	19	7
Ipu	91	48
Ipueiras	76	25
Jaguaruana	42	23
Maranguape	7	14
Massapê	62	26
Mocambo	33	5
Nova Russas	17	15
Russas	43	43
Sobral	104	34
Tianguá	40	18
Viçosa	148	52
Totais	765	320
% de redução	—	58,2

A fim de tornar claro que essa redução não correu por conta da ação de outras medidas, elaboramos os Quadros III e IV, para comparar a queda do número de casos em 14 municípios não dedetizados com 14 municípios dedetizados. Essa era a única diferença de tratamento entre os dois grupos.

Nos municípios não dedetizados (Quadro II) o trabalho desenvolve-se de 1953 a 1960 num ritmo que permitiu o conhecimento de casos da ordem de 11,9% a mais no último quatriênio em relação ao primeiro. É claro que isso foi uma conseqüência do desenvolvimento do serviço, permitindo maior eficiência na procura e no diagnóstico dos casos. Se tivermos em conta apenas o último quatriênio e separarmos os dois biênios veremos que o segundo acusou 4,2% mais de casos.

No segundo grupo de municípios (Quadro III) dedetizados segundo a orientação que ficou delineada acima, vamos encontrar,

QUADRO IV

Resultados das dedetizações realizadas no Estado do Ceará para profilaxia do calazar

Municípios	Data da dedetização		Nº de localidades dedetizadas	Localidades com casos humanos	
	Mês	Ano		Antes	Depois
Cariré	Janeiro	1957	87	7	—
Coreaú	Outubro	1956	352	24	4
Freicheirinha	Outubro	1956	71	4	3
Granja	Agôsto	1958	631	39	7
Ipu	Julho	1954	99	3	15
Ipu	Setembro	1958	376	33	5
Ipueiras	Novembro	1958	139	19	3
Jaguaruana	Fevereiro	1958	97	18	13
Maranguape	Outubro	1958	43	4	1
Massapê	Julho	1954	336	7	13
Massapê	Novembro	1958	114	13	—
Mocambo	Julho	1957	85	14	2
Mocambo	Setembro	1958	72	2	—
Nova Russas	Novembro	1958	116	3	1
Russas	Março	1956	37	4	1
Sobral	Abril	1954	333	16	6
Sobral	Setembro	1956	210	6	6
Tianguá	Outubro	1954	13	5	3
Tianguá	Dezembro	1956	46	3	1
Tianguá	Janeiro	1957	111	1	1
Tianguá	Novembro	1958	26	1	—
Viçosa	Junho	1954	131	19	19
Viçosa	Março	1957	330	19	7
Viçosa	Agôsto	1958	80	7	—
Totais			3.935	271	111

ao invés de um aumento de casos, uma redução de 58,2% no segundo quatriênio em relação ao primeiro e de 36,2% do último sôbre o penúltimo biênio.

Essas cifras são bastante significativas da interferência dêsse fator. Acreditamos que a redução não foi maior porque a dedetização não foi feita na medida do que era necessário, nem também o foi na época aconselhável, aquela que antecede a queda das chuvas, após as quais a densidade de flebótomos aumenta e com isso o contágio se intensifica.

e) *Contrôle dos reservatórios* — Será uma prática aconselhável a destruição de todos os cães vagabundos e o exame sorológico periódico dos cães de estimação, de guarda ou de caça, que devem ser controlados com registros rigorosos.

SUMMARY

Prophylaxis of kala-azar in Ceará, Brazil.

The author describes the prophylactic methods carried out against kala-azar in the State of Ceará, Brazil, emphasizing specially the discovery and treatment of human cases, discovery and elimination of canine cases and destruction of domiciliary sandflies by the use of DDT.

In the treatment of 2,096 cases the following drugs were used: N-metil-glucamine antimoniate (Glucantime), antimony hexonate (Solustibosan) and the diamidine di-fenoxipentane (Lomidine).

In a second step, 279,423 dogs were examined from 1953 to 1960 of which 78,929 were eliminated, considering the serological findings and the clinical symptoms too.

The third point refers to the use of DDT spraying in the proportion of 1.5 g per m^2 of walls inside and outside the houses, as well as animal shelters. Two groups of 14 counties each are compared: in the group in which DDT spraying was not used, there was an increase of 11.9% of cases in the last 4 years in relation to the first. In the group in which DDT spraying was used there was a reduction of 58.2% in the number of cases.

REFERÊNCIAS

1. ALENCAR, J. E. de — Calazar canino: contribuição para estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Fortaleza, 1959. Tese Fac. Med. Univ. Ceará.

2. ALENCAR, J. E. de — Incidência da leishmaniose canina no Piauí: meios diagnósticos num inquérito. Ceará méd. **36**(2/4):3-12, 1958.

3. ALENCAR, J. E. de & ARAGÃO, T. C. — Tratamento da leishmaniose visceral em Sobral, Ceará. Trabalho apresentado ao 12º Congr. brasil. Hig., Belém, 1953.

4. ALENCAR, J. E. de & COELHO *Neto*, B. — Leishmaniose canina no Ceará. Trabalho apresentado ao 13º Congr. brasil. Hig., Fortaleza, 1956.

5. ALENCAR, J. E. de; HOLANDA, D. & CAVALCANTE, J. D. N. — Calazar no vale do Jaguaribe, Ceará, 1955. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. **8**:33-47, 1956.

6. ANSARI, N. & FAGHIH, M. — Leishmaniose cutanée à *L. tropica* chez *Rhombomys opimus*. Ann. Parasitol. hum. & comp. **28**:241-246, 1953.

7. CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; CASTRO, G. O.; FERREIRA, L. C. & ROMANA, C. — Leishmaniose visceral americana: relatório dos trabalhos da comissão encarregada dos estudos da leishmaniose visceral americana em 1936. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **32**:321-390, 1937.

8. CORRADETTI, A. — Esperimento di prevenzione della leishmaniosi cutanea nella regione del Medio Adriatico. Congr. internaz. Ig. & Med. mediterr., 3º, Palermo, 1951. p. 166-167.

9. DEANE, L. M. & DEANE, M. P. — Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani* no Ceará. Hospital, Rio de Janeiro **45**:703-707, 1954.

10. DEANE, L. M. & DEANE, M. P. — Encontro de leishmânias nas vísceras e na pele de uma rapôsa, na zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. Hospital, Rio de Janeiro **45**:419-421, 1954.

11. DEANE, L. M. & DEANE, M. P. — Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. Hospital, Rio de Janeiro **47**:75-87, 1955.

12. DEANE, L. M. & DEANE, M. P. — Observações preliminares sôbre a importância comparativa do homem, do cão e da ra-

pôsa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar, no Ceará. Hospital, Rio de Janeiro **48**:61-76, 1955.

13. DEANE, L. M. & DEANE, M. P. — Sôbre a biologia do *Phlebotomus longipalpis*, transmissor da leishmaniose visceral, em uma zona endêmica do Estado do Ceará. I. Distribuição, predominância e variação estacional. Rev. brasil. Biol. **15**:83-95, 1955.

14. DEANE, L. M.; DEANE, M. P. & ALENCAR, J. E. de — Observações sôbre o combate ao *Phlebotomus longipalpis* pela dedetização domiciliária, em área endêmica de calazar no Ceará. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. **7**:131-141, 1955.

15. DEANE, M. P. & DEANE, L. M. — Infecção natural do *Phlebotomus longipalpis* por leptomonas, provàvelmente de *Leishmania donovani*, em um foco de calazar no Ceará. Hospital, Rio de Janeiro **45**:703-707, 1954.

16. GUIMARÃES, F. N. & BUSTAMANTE, F. M. — A aplicação domiciliária de DDT como base de profilaxia da leishmaniose: estudo de um foco de leishmaniose mucocutânea cinco anos depois da aspersão periódica com aquêle inseticidade. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. **6**:127-130, 1954.

17. HERTIG, M. — *Phlebotomus* and residual DDT in Greece and Italy. Amer. J. trop. Med. **29**:773-809, 1949.

18. NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S. & ALENCAR, J. E. — Leishmaniose visceral canina: reação de fixação do complemento com antígeno extraído do bacilo da tuberculose. Hospital, Rio de Janeiro **52**: 111-123, 1959.

19. KARAPETYAN, R. M.; PETROSYAN, N. A.; ALEKSANYAN, E. A. & VIRABYAN, E. — The control of visceral leishmaniasis in a nidus. Resumo em Rev. appl. Entomol., ser. B **44**:154, 1956.

20. KAVICHIUSKII, B. S. — Something new in the control of sandflies under natural conditions in the Ohen. Resumo em Rev. appl. Entomol., ser. B **43**:108, 1955.

21. LU, C. C.; CHUNG, H. L.; LING, C. C.; WU, C.C.; WANG, C. C.; CHIANG, Y. T. & HSU, W. F. — New China's achievement in the treatment and prevention of kala-azar. Chinese med. J. **73**:91-99, 1955.

22. NASIR-UD-DIN, M. — DDT in the prevention of kala-azar in East Pakistan. Pakistan J. Health **2**:21-24, 1952.

23. PELLEGRINO, J. & BRENER, Z. — Reação de fixação do complemento com sangue dessecado no diagnóstico do calazar canino. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. **10**: 39-44, 1958.

Recebido para publicação em 18 abril 1961.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(4):181-185, julho-agôsto 1961

CDU 616.995.132.2·
576.8.077.031:611.778

OBSERVAÇÕES SÔBRE A REAÇÃO INTRADÉRMICA COM ANTÍGENO DE *STRONGYLOIDES RATTI* EM PACIENTES COM ESTRONGILOIDOSE

J. Pellegrino, G. Chaia e J. M. Pompeu Memoria

RESUMO

Foi preparado um extrato de larvas filariformes de *Strongyloides ratti* em solução de Coca mertiolatada e foi estudado o comportamento da reação intradérmica, com êste antígeno, em 30 pacientes com estrongiloidose. O antígeno foi utilizado em três diferentes concentrações contendo 40, 4 e 0,4 μg de N por ml. Foi constatada uma relação linear entre o logaritmo das concentrações do antígeno e as áreas médias das pápulas. Foi sugerido que para o estudo dos diversos fatôres que podem influir nos resultados da reação intradérmica com antígeno de *S. ratti* bem como para avaliação do valor diagnóstico, o antígeno deva ser utilizado em concentração tal que contenha cêrca de 40 μg de N por ml.

INTRODUÇÃO

Em 1925, Fülleborn [4] mostrou que pacientes com estrongiloidose apresentam uma sensibilização cutânea específica que pode ser evidenciada por meio de testes por escarificação com larvas dessecadas e pulverizadas de *Strongyloides stercoralis*. No ano seguinte, o mesmo autor (Fülleborn [3]) apresentou os resultados de observações feitas em 11 pacientes (10 com exame positivo para largas de *S. stercoralis* e um caso suspeito de infecção por êste helminto): em 4, as reações foram fracamente positivas (+) e, em 7, fortemente positivas (+++ e ++++). O antígeno para as provas de escarificação foi preparado com larvas filariformes de *S. stercoralis*, lavadas em solução de bicloreto de mercúrio a 1:1.000 e em seguidas dessecadas. Em 28 indivíduos não infectados pelo *S. stercoralis*, incluindo vários casos com infecção ativa ou extinta pelo *Ascaris lumbricoides*, as reações foram negativas. Segundo Fülleborn, um teste cutâneo com antígeno de *S. stercoralis*, quando positivo, teria significado diagnóstico de estrongiloidose ativa ou extinta.

Brannon & Faust [2] estudaram o comportamento da reação intradérmica com antígeno preparado com larvas filariformes de *Strongyloides*, provàvelmente *S. fülleborni*, obtidas pela cultura de fezes eliminadas por chipanzés (*Pan satyrus*) naturalmente infectados. As larvas filariformes foram suspensas em solução de Coca contendo 0,4% de fenol e em seguida trituradas em gral de ágata com pó de esmeril estéril. Após extração à temperatura ambiente por 24 horas, seguida de igual período a 37°C, a suspensão foi filtrada em Seitz e depois dessecada sob vácuo em dessecador contendo ácido sulfúrico. O resíduo sêco foi pesado e dissolvido em água destilada estéril de modo a corresponder a uma concentração de 1:100. A reação intradérmica praticada com êste antígeno foi positiva em 23 de 25 pacientes com estrongiloidose; em 4 casos de estrongiloidose extinta a reação intradérmica foi positiva em 2. Como contrôle, a reação foi praticada em 108 indivíduos com exames de fezes negativo para *S. stercoralis* e sem história de infecção por êste

Instituto Nacional de Endemias Rurais, Centro de Pesquisas de Belo Horizonte e Instituto de Biologia, Faculdade de Filosofia da Universidade de Minas Gerais, Brasil.

helminto. A reação foi positiva em apenas 3 casos: um apresentava infecção por ancilostomídeo e *Trichocephalus* e nos dois restantes o exame de fezes havia sido negativo para helmintos. Concluíram os autores que o teste cutâneo por êles praticado era altamente específico para a infecção pelo *S. stercoralis*.

O *Strongyloides ratti* Sandground, 1925 é um helminto de ratos silvestres: infecta fàcilmente o rato branco e pode ser mantido no laboratório sem dificuldades. Larvas filariformes podem ser obtidas em grande número a partir de culturas de fezes de animais infectados, o que torna extremamente simples o preparo de antígeno para reação intradérmica.

MATERIAL E MÉTODOS

Casos de estrongiloidose — A reação intradérmica foi praticada em 30 pacientes adultos do sexo masculino, com idades compreendidas entre 21 e 38 anos e com exame de fezes positivo para larvas de *S. stercoralis*.

Oito pacientes adultos do sexo masculino, com 5 exames de fezes negativos para larvas de *S. stercoralis* (método de Baermann), serviram como contrôle.

Antígeno — Ratos jovens, pesando cêrca de 50 g, foram infetados, por via subcutânea, com 2.000 larvas filariformes de *S. ratti*. Dez a 15 dias depois da infecção, as gaiolas onde estavam os animais infectados foram colocadas sôbre bandejas esmaltadas forradas com papel absorvente umedecido e deixadas até o dia seguinte para que as fezes pudessem ser colhidas sem excessivo dessecamento. Depois de colhidas, as fezes foram misturadas com igual quantidade de carvão animal granulado, prèviamente umedecido. Mantendo-se a mistura em lugar escuro, à temperatura ambiente (cêrca de 20°C), larvas filariformes podem ser observadas após 48-72 horas, movendo-se ativamente sôbre a superfície da cultura. O isolamento das larvas filariformes para o preparo do antígeno foi feito pelo método de Baermann [1] utilizado para o isolamento de larvas de nematóides do solo. Para isso, foram utilizados funis de vidro com 250 ml de capacidade contendo água aquecida a 40°C. A cultura era colocada sôbre um pedaço de morim e em seguida transferida para o funil de modo a alcançar o nível da água. Esta operação era facilitada pela interposição de uma tela metálica entre o morim e a água. As larvas filariformes migram ativamente para a água aquecida e podem ser vistas a ôlho nu, com iluminação oblíqua, ou com o auxílio de uma lente. As larvas foram concentradas por simples sedimentação. Após lavagens sucessivas em água destilada estéril, as larvas concentradas em pequeno volume líqüido foram transferidas para empolas e em seguida liofilizadas.

O antígeno utilizado no presente trabalho foi preparado da seguinte maneira: 12 mg de larvas filariformes (*S. ratti*) liofilizadas foram trituradas em gral com areia lavada e esterilizada. Em seguida, foram adicionados 12 ml de solução de Coca mertiolatada a 1:5.000 e a suspensão foi transferida para um frasco contendo pérolas de vidro. A extração foi feita na geladeira (4 a 6°C) por 3 dias, agitando-se freqüentemente o frasco. A suspensão foi finalmente centrifugada a 3.000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante (concentração 1:1.000 em relação ao pêso das larvas liofilizadas) foi usado como antígeno depois de tindalizado. A determinação do azôto total foi feita pelo método de Koch-McMeekin com "nesslerização" direta (Koch & Hanke [5]).

O antígeno de *S. ratti* foi usado em três concentrações diferentes: 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000, contendo, respectivamente, 40,4 e 0,4 μg de N total por ml. As diversas diluições do antígeno foram feitas com solução de Coca mertiolatada.

Reação intradérmica — As reações intradérmicas foram feitas na parte média da face flexora do antebraço, tendo-se injetado 0,05 ml de cada diluição do antígeno e da solução contrôle (Coca mertiolatada) em todos os 30 pacientes com estrongiloidose, com seringa BD de 0,25 ml, munida de agulha BD-27. Foi feita prévia casualização em relação às diluições do antígeno, solução contrôle e locais dos antebraços.

As áreas das pápulas foram determinadas nos decalques tomados em papel absorvente, ligeiramente umedecido, após delimitação de seu contôrno a tinta, 15 minutos após a injeção intradérmica (PELLEGRINO & MACEDO [6]).

Análise estatística — Constou a análise estatística do estudo da regressão linear das áreas médias das pápulas em relação aos logaritmos das concentrações do antígeno.

RESULTADOS

Os resultados obtidos acham-se resumidos nos Quadros I e II e na Fig. 1. Com o antígeno usado na maior concentração (1:1.000, contendo 40 μg de N por ml), em 93,3% das reações a área das pápulas foi de 1,0 cm² ou mais (Fig. 2). Na concentração imediatamente inferior (4 μg N/ml), 60% das reações corresponderam a pápulas de 1,0 cm² ou mais e, com o antígeno a 1:100.000 (0,4 μg N/ml), tôdas as reações tiveram áreas inferiores a 1,0 cm². Com esta última concentração do antígeno, os resultados se aproximaram daqueles obtidos com a solução contrôle (Coca mertiolatada a 1:5.000).

Nos 8 indivíduos tomados como contrôle (5 exames de fezes negativos para larvas de *S. stercoralis* usando-se o método de Baermann) o teste cutâneo com o antígeno de *S. ratti* a 1:1.000 (40 μg N/ml) deu pápulas sempre com áreas inferiores a 0,9 cm². A área média foi de 0,47 cm².

QUADRO II

Áreas médias das pápulas (cm²) obtidas em 30 pacientes com estrongiloidose 15 minutos após a injeção de 0,05 ml de cada diluição do antígeno de *S. ratti* e da solução contrôle (Coca mertiolatada)

Concentração do antígeno (μg N/ml)	Área média das pápulas (cm²)
40,0	1,60
4,0	0,99
0,4	0,51
Contrôle (sol. de Coca mertiolatada)	0,48

Erro padrão das médias = ± 0,05

A Fig. 1 mostra a existência de uma relação linear entre os logaritmos das concentrações do antígeno de *S. ratti* e as áreas médias das pápulas. A equação da reta de regressão, obtida pelo método dos mínimos quadrados, foi a seguinte:

$$\hat{y} = 0{,}70 + 0{,}55\,x$$

QUADRO I

Resultados das reações intradérmicas feitas com o antígeno de *S. ratti* e com a solução contrôle em 30 pacientes com estrongiloidose

Concentração do antígeno (μg N/ml)	Áreas das pápulas (cm²)		
	≤ 0,9	1,0-1,1	≥ 1,2
40,0	2 (6,7%)	4 (13,3%)	24 (80,0%)
4,0	12 (40,0%)	10 (33,3%)	8 (26,7%)
0,4	30 (100,0%)	—	—
Contrôle (sol. de Coca mertiolatada)	30 (100,0%)	—	—

A análise de variância revelou que o desvio da linearidade não foi estatìsticamente significativo.

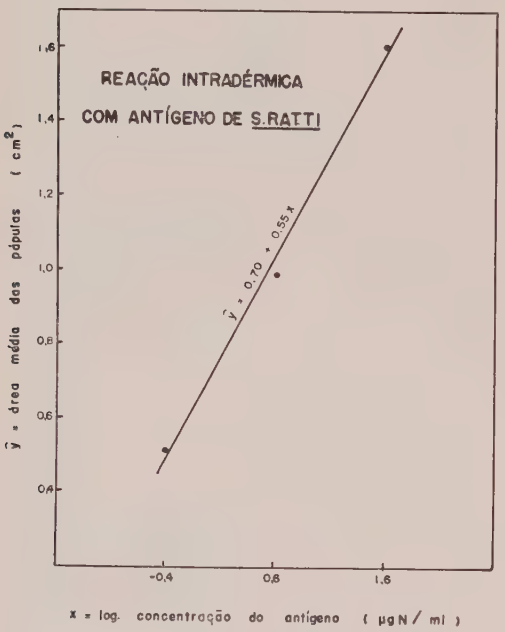


Fig. 1 — Regressão linear da área média das pápulas em relação aos logaritmos das concentrações do antígeno.

DISCUSSÃO

A observação de que existe uma relação linear entre o logaritmo das concentrações do antígeno de *S. ratti* e as áreas médias obtidas, dentro do limite das concentrações utilizadas, indica que, como na esquistossomose (Pellegrino, Memoria & Macedo [8]), também na estrongiloidose a reação intradérmica pode ser encarada sob um aspecto quantitativo. Isto possibilitará o estudo da influência de diversos fatôres sôbre os resultados da reação intradérmica (idade, sexo, côr, local da reação, etc.), como foi feito na esquistossomose mansoni (Pellegrino & Memoria [7]). Entretanto, a análise dos dados obtidos indica que, embora tenha sido constatada uma relação linear entre o logaritmo da dose e a reação cutânea média, nos limites de concentração do antígeno compreendidos entre 0,4 a 40 µg N/ml (10^{-5} a 10^{-3}), a resposta foi pouco evidente com o antígeno contendo 4 µg de N/ml (10^{-4}) e semelhante à resposta obtida com a solução contrôle quando o antígeno foi empregado na concentração correspondente a 0,4 µg N/ml (10^{-5}). Recomenda-se, portanto, que para o estudo dos diversos fatôres que podem interferir na reação intradérmica bem

Fig. 2 — Reação intradérmica com antígeno de *Strongyloides ratti* (40 µg N/ml) feita no antebraço de pacientes com estrongiloidose.

como no estabelecimento do seu possível valor diagnóstico, a concentração do antígeno deva ser ajustada de modo a conter cêrca de 40 μg de N/ml.

Como foi feito na esquistossomose mansoni, torna-se necessário estabelecer o critério a ser adotado na interpretação da reação intradérmica na estrongiloidose utilizando-se antígeno de *S. ratti*. Para isso, o comportamento da reação em indivíduos seguramente livres de infecção pelo *S. stercoralis*, bem como em diferentes grupos de pacientes com estrongiloidose e portadores de outras helmintoses precisa ser conhecido.

SUMMARY

Intradermal test with Strongyloides ratti *antigen in human strongyloidiasis.*

Skin tests were performed on 30 patients with strongyloidiasis using a merthiolated Coca's extract prepared from filariform larvae of *S. ratti*. The antigen was used in 3 concentrations containing 40.4 and 0.4 μg N per ml. There was a linear relationship between the log concentrations of the antigen and the mean area of the wheals. It was suggested to use the antigen diluted as to contain about 40 μg N per ml in order to assess the diagnostic value of the test and to study the factors influencing the cutaneous response.

REFERÊNCIAS

1. BAERMANN, G. — Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Medeleel. mit. h. Geneesk. Lab. te Weltvreden. Feestbundel, Batavia, 1917. p. 41-47.

2. BRANNON, M. J. C. & FAUST, E. C. — Preparation and testing of a specific antigen for diagnosis of human strongyloidiasis. Am. J. trop. Med. **29**:229-239, 1949.

3. FÜLLEBORN, F. — Spezifische Kutanreaktionen bei Infektion mit *Strongyloides* und anderen Helminthen. Arch. f. Schiffs-u. Tropen-Hyg. **30**:732-749, 1926.

4. FÜLLEBORN, F. — Über Cutanreaktion bei Strongyloidesinfektion. Klin. Wochenschr. **4**:1709, 1925.

5. KOCH, F. C. & HANKE, M. E. — Practical methods in biochemistry. 5ª ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1948.

6. PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G. — Novo critério de leitura da reação intradérmica na esquistossomose. Rev. brasil. Malariol. & Doenças trop. **8**:499-509, 1956.

7. PELLEGRINO, J. & MEMORIA, J. M. P. — A reação intradérmica na esquistossomose mansoni. III. Influência da idade, sexo, côr e local da reação. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo **2**:218-223, 1960.

8. PELLEGRINO, J.; MEMORIA, J. M. P. & MACEDO, D. G. — Quantitative aspects of the intradermic test with cercarial antigen in schistosomiasis. J. Parasitol. **43**:304-307, 1957.

Recebido para publicação em 25 julho 1961.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(4):186-208, julho-agôsto 1961

CDU 616.995.132.1-036.22
:91(81)

CONDIÇÕES GEOGRÁFICAS DA DISTRIBUIÇÃO DA ANCILOSTOMOSE NO BRASIL

Dora Wanderley Rey

RESUMO

A incidência da ancilostomose no Brasil apresenta estreita relação com o clima. De um modo geral, os índices de infestação são elevados, estando os mais freqüentes entre 40 e 60% de positividade. Justifica-se êsse fato pelas temperaturas elevadas, características de país tropical; pelas chuvas abundantes, que ocorrem na maior extensão do Brasil, e pela precariedade das condições sanitárias, especialmente no meio rural, mas também nas vilas, pequenas cidades e periferia dos grandes centros.

Algumas áreas destacam-se mostrando uma incidência muito alta. São principalmente a planície e baixadas litorâneas, devido às médias térmicas elevadas e às chuvas abundantes e regulares, determinadas pelos ventos carregados de umidade que vêm do oceano. O problema médico-sanitário assume graves proporções porque aí estão as maiores densidades demográficas do País.

As mais elevadas incidências (superiores a 80%) correspondem à Zona Bragantina, ao Estado do Maranhão de um modo geral e ao litoral do Estado de São Paulo, onde os fatôres favoráveis se potencializam.

Fora da orla marítima, apenas a encosta oriental do Planalto Central, na Bahia, a Encosta Sul, em Mato Grosso e o interior de São Paulo (Zonas de Ribeirão Prêto, Bauru e Rio Prêto, ao que se sabe) apresentaram grandes taxas de infestação.

Possuem médias inferiores a 40%, principalmente: o baixo Amazonas e ilhas; a zona do Planalto, em Goiás; o planalto da Mantiqueira e a Zona Metalúrgica de Minas Gerais; a zona do Alto da Serra, no Estado do Rio de Janeiro.

As mais salubres coincidem com o Nordeste semi-árido e os níveis mais elevados do Planalto Meridional, onde o clima mesotérmico, com temperaturas baixas nos meses de inverno, não propicia a evolução das larvas no solo.

Algumas áreas urbanizadas vão determinar sensível queda no índice da infestação, apesar das condições favoráveis do meio físico, demonstrando que o estado sanitário das populações depende, mais do que tudo, de seus padrões econômicos e sociais.

INTRODUÇÃO

A ancilostomose é uma das principais endemias do país, tanto pela extensão e freqüência de sua ocorrência em todos os Estados brasileiros [35, 42, 43], como pelos efeitos anemiantes que comprometem o desenvolvimento das crianças e capacidade de trabalho dos adultos.

Interpretar os "porquês" de sua prevalência nas diferentes áreas do país e relacioná-las às condições geográficas, onde se reco-

Fac. Medicina da Univ. São Paulo — Inst. Med. Tropical — Dept. Parasitologia (Prof. A. D. F. Amaral).

nhecem elementos favoráveis e desfavoráveis à transmissão da verminose, pode concorrer para a programação de campanhas de saúde pública e para a modificação, sob alguns aspectos, da paisagem humana, no Brasil.

Essa é a razão pela qual se torna necessário um estudo da doença dentro do quadro geográfico, ou melhor, dentro daquela unidade de ordem superior que SORRE [44] denomina o "complexo patogênico" de uma dada moléstia.

O conjunto de fatôres geográficos, biológicos e médicos que condicionam a existência de determinada doença, em uma região, e suas variações epidemiológicas, levou MAX SORRE, em 1933, a criar o conceito de "complexo patogênico". Entram ali, como elementos, tanto o homem e o agente causal da doença, como os vetores, os reservatórios do vírus, etc., isto é, todos os componentes do ciclo evolutivo do parasito, bem como o habitat e as condições exigidas em cada fase do ciclo.

Os complexos patogênicos exibem uma dependência mais ou menos acusada em relação às condições do meio e suas variações; particularmente quando existem hospedeiros intermediários ou fases de vida livre, em que o parasito deve suportar, sem maiores proteções, tôda a rudeza do clima e as viscissitudes de uma sobrevivência onde a falta de alimentos ou os inimigos naturais podem alterar quantitativa ou qualitativamente os dados do problema.

Na ancilostomose, a suscetibilidade à doença é geral, notando-se maior incidência em crianças, principalmente em idade escolar e pré-escolar. Os negros são mais resistentes ao parasitismo que os brancos e os pardos. Segundo PESSÔA [35], o número de vermes albergados pelos indivíduos, em zonas de baixa endemicidade, reduz-se consideràvelmente acima dos 20 anos, o que não sucede onde a poluição do solo é elevada. Por outro lado, FOSTER & CORT [17] demonstraram a importância da alimentação na aquisição de uma certa resistência aos vermes. No mesmo sentido convergem as observações de W. O. CRUZ [15] sôbre a influência das dietas ricas em ferro e proteínas (consumo de carne, especialmente) na prevenção da anemia ancilostomótica.

A probabilidade de contaminação é função, em primeiro lugar, do grau de poluição do solo e, êste, dos hábitos anti-higiênicos das populações que contaminam os terrenos com fezes ricas em ovos, bem como do número de vermes que os pacientes albergam no intestino. As infecções ou reinfecções humanas dependem, por outro lado, do contato íntimo com o solo realizado por crianças ou por adultos, especialmente quando não se faz uso de calçado ou quando o tipo de atividade obriga ao manuseio da terra (agricultura, mineração, horticultura, etc.).

Os ovos dêsses parasitos expulsos com as fezes humanas e depositados no solo necessitam de alguns requisitos para a evolução posterior: o ar, uma certa quantidade de calor e umidade. No interior da massa fecal, isto é, na ausência de ar, os ovos permanecem vivos por alguns dias, mas não se desenvolvem. Mas, em contato com o oxigênio, 28 a 30°C constituem ótima temperatura para a evolução do *A. duodenale*. Abaixo de 20°C torna-se lento o processo, cessando completamente aos 10°C, se bem que os ovos ainda conservem sua viabilidade por mais 6 a 8 semanas [8, 35].

Uma certa umidade é indispensável ao ôvo que não suporta a dessecação, sendo destruído pela ação direta dos raios solares.

Durante os poucos dias necessários para alcançar o estádio infestante, as larvas dos ancilostomídeos permanecem próximas aos locais da eclosão, nutrindo-se ativamente. A larva madura já não se alimenta e nas condições favoráveis de umidade e temperatura, mantém-se na superfície ou nas camadas mais elevadas do solo, apresentando o hábito de, só ou em grupos, subir às pontas dos objetos salientes, como fôlhas mortas, grãos de areia e outras partículas do solo, de onde estende o corpo e, movendo-se alternadamente para frente e para trás, aguarda ocasião de pôr-se em contato com a pele humana. Sua ascensão no solo vai sòmente até onde conta com a proteção de uma camada de umidade. Quando a superfície seca, as larvas retraem-se para depressões e fendas do terreno, ou mesmo para o interior do solo poroso, reaparecendo em poucos minutos, desde que volte a contar com a umidade superficial.

As larvas do necátor e dos ancilóstomos respondem a outros estímulos e apresentam tropismos, sendo um dêles o termotropismo, atingindo ativamente máxima a 35 ou 40°C. Abaixo de 15°C, elas permanecem pràticamente sem movimentos, especialmente se sofrerem uma brusca transição de altas para baixas temperaturas.

Um excesso de água no solo pode ser responsável pela destruição das larvas, fàcilmente transportadas pela correnteza. Os solos arenosos e absorventes, mantendo junto à superfície uma certa umidade, são favoráveis à sobrevivência dos vermes, enquanto que os argilosos, impermeáveis, associados às chuvas torrenciais, proporcionam o arrastamento mecânico dos mesmos e conseqüente descontaminação do meio [8].

As chuvas abundantes, provocando a lixívia dos solos, constituem outro fator desfavorável às larvas, uma vez que o meio ácido resultante da dissolução dos sais é prejudicial ao seu desenvolvimento.

Nas regiões em que a pluviosidade é pequena ou a estação sêca é prolongada, as precipitações sendo menores que a evaporação, a água sobe por capilaridade do lençol freático para as camadas da superfície, alcalinizando-as.

O regime das chuvas, em cada lugar, pode interferir como outro fator favorável ou desfavorável, inclinando-se neste último sentido quando houver uma estação sêca muito prolongada.

MATERIAL E MÉTODOS

A maioria dos dados que utilizamos nesta análise foram os apresentados no Inquérito Helmintológico Escolar, dos sanitaristas A. Barca Pellon e Isnard Teixeira, da Divisão de Organização Sanitária do Departamento Nacional de Saúde. Publicaram êles dois trabalhos fundamentais [33, 34], em 1950 e 1953, abrangendo o primeiro um inquérito feito nos Estados litorâneos, desde o Maranhão até o Espírito Santo, além de Minas Gerais, nos anos de 1947 a 1950; o segundo, relativo a cinco Estados das Regiões Leste, Sul e Centro-Oeste, em 1952. Infelizmente, ficaram até aqui sem execução os planos referentes aos Estados de São Paulo *, Guanabara, Amazonas, Pará e Territórios. Quanto ao Rio Grande do Sul, permaneceu o trabalho incompleto e ainda inédito, dêle nos sendo possível citar, com as devidas reservas, apenas as taxas de ancilostomose de algumas localidades cujos índices haviam sido comunicados ao Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O inquérito de Pellon & Teixeira consistiu no exame de uma única amostra de fezes, pelo método de sedimentação espontânea, dos escolares cujas idades estavam compreendidas entre 7 e 14 anos e que freqüentavam, via de regra, escolas de localidades com 1.500 habitantes ou mais.

Fora daquelas áreas, procuramos, não sem grandes dificuldades, colecionar dados esparsos de investigações feitas em pequenas regiões ou localidades isoladas, por diferentes autores, entre os quais Cardoso *et al.*[6], Corrêa *et al.*[10, 11], Lara *et al.*[26], Mercer [28], Pessôa *et al.*[36 a 39], Costa [12 a 14], Causey *et al.*[7], Galvão [18], e outros [9, 16, 19, 30, 32, 42, 43].

A comparabilidade dessas taxas de parasitismo deve ser encarada com alguma reserva e só delas nos utilizamos para não deixar grandes claros no mapa da endemia, nem abandonar, sem qualquer indicação, as tendências do fenômeno em vários Estados brasileiros.

Quando os dados são de inquéritos feitos por outros autores, e havendo discriminação dos resultados por grupos etários, adotamos sempre os índices relativos ao grupo 7-14 anos, ou o que dêle mais se aproximasse.

No presente trabalho, utilizamos a Divisão Regional do Brasil fixada pela resolução n.° 461, de 7 de julho de 1955, da Assembléia Geral do Conselho Nacional de Geografia (Fig. 1).

Os dados epidemiológicos foram reagrupados segundo essa divisão regional, adotada em 1955, e apresentados em tabelas (Quadros IV a VIII), bem como na prancha colorida que acompanha êste trabalho.

* O inquérito realizado no Estado de São Paulo [31], em 1947, permanece ainda inédito quanto aos resultados.

Os números das Zonas geográficas encontrados na Fig. 1 correspondem aos que precedem os nomes das Zonas nos quadros acima referidos.

GRANDE REGIÃO NORTE

Da extensa região amazônica apenas uma pequena parte foi atingida por inquéritos helmintológicos (COSTA [12 a 14] e CAUSEY *et al.*[7]). O problema da ancilostomose que seria interessante pesquisar nessa área, para estudo do complexo patogênico em população extremamente rarefeita e econômicamente atrasada, é quase impossível por falta de dados (Figs. 1 e 2 e Quadro IV).

Na Zona Bragantina a incidência da verminose é elevadíssima, constituindo mesmo a mais alta de todo o Brasil. Os índices de positividade calculados atingiram mais de 90% da população, se excluirmos a cidade de Belém.

Apresenta essa zona um clima quente e úmido, com estação sêca de pequena duração, classificado como Am por KÖPPEN [25]. A abundância das chuvas anuais exemplificada nos totais obtidos em Igarapé-Açu (2367,4 mm) e Tracateua (2536,1 mm) compensa perfeitamente a relativa estiagem [22].

Além dos fatôres favoráveis do clima, contribui para essa incidência a forte concentração de população, ímpar em todo o vale amazônico, que se dedica, principalmente, às atividades agrícolas.

Em Belém, cujo clima, devido a condições locais, é mais úmido, onde a pluviosidade atinge 2732 mm anuais, distribuídos regularmente (Af), a taxa de incidência da doença decai para 44,8 como conseqüência das condições urbanas.

Outros dados colhidos ainda na Região da Planície Litorânea, nas proximidades da foz do grande rio, revelam fraca incidência. Apesar do clima conservar-se do tipo Am, havendo apenas uma pequena diminuição da pluviosidade a oeste de Marajó, a incidência da ancilostomose é baixa, como podemos verificar nos índices colhidos nas Zonas Tocantina (38,0%), Guajarina (35,1%) e do Baixo Amazonas (31,1%).

A explicação talvez resida nas características do habitat, que é disperso, ou na situação das cidades na várzea do Amazonas, ou ainda no tipo utilizado de habitação sôbre estacas. Podemos citar como exemplo Abaetetuba, cidade ribeirinha, que apresenta parte das ruas construída sôbre estacas (estiva), a fim de proteger-se das enchentes. Os ovos e larvas dos ancilostomídeos, lançados diretamente na água do rio e alagadiços, vão ao fundo, não havendo condições para a infestação humana.

Um elemento ainda pode justificar essa baixa endemicidade da ancilostomose na foz do Amazonas qual seja o pH baixo das águas encontrado aí. SIOLI [41], estudando êsse assunto, constatou que a parte ocidental, vizinha de Belém correspondente ao quaternário, apresentava igarapés ácidos enquanto que na parte oriental predominavam igarapés de águas neutras.

Faltam-nos dados para constatação dêsses fatos em outros pontos do vale, dispondo apenas de índices relativos à Zona do Tapajós, na Região da Encosta Setentrional do Planalto Brasileiro, onde a incidência é de 68% dos examinados, Itaquatiara, no Médio Amazonas, apresenta 60% de infestação e Manaus 29,7%, havendo aqui a influência da área urbana incluída na apreciação.

GRANDE REGIÃO NORDESTE

Região do Meio Norte

Constituída pela maior parte dos Estados do Maranhão e Piauí, estão presentes nessa Região todos os fatôres favoráveis à transmissão da ancilostomose. As condições climáticas justificam os altos índices de infestação dos escolares, que figuram entre os maiores do Brasil (Quadro V).

As médias térmicas superiores a 25°C, situam-se dentro dos valores ótimos para a eclosão do ôvo e desenvolvimento da larva.

Quanto à pluviosidade, com exceção da Zona do Sertão do Piauí, a sudeste, é sempre elevada e regular, diminuindo do oeste para leste, à medida que se acentua a estação sêca. As maiores alturas anuais de chuvas caem nas proximidades da Amazônia, como o ilustra a cidade de São Luís, situada na Zona do Litoral Norte, que apresenta 2087,9 mm [29].

No Sertão do Piauí, as chuvas são bem menos abundantes, oscilando entre 700 e 800 mm, razão pela qual essa Zona faz parte do chamado Sertão hipoxerófito, em que a umidade não é tão reduzida quanto no hiperxerófito.

Correspondendo a uma grande bacia sedimentar, limitada a leste, oeste e sul pelas rochas cristalinas do complexo brasileiro, apresenta em grandes extensões solos arenosos permeáveis [22]. O clima quente e úmido favorece em algumas partes a formação de crosta limonítica, mais freqüentemente nas superfícies elevadas que nas baixadas. Esta entretanto, não é muito espêssa, medindo alguns decímetros apenas e aparece fragmentada, recobrindo a superfície do solo.

Ao longo dos rios, na planície do Meio Norte, desenvolve-se uma baixada com abundante sedimentação fluvial e solos alcalinos, onde as larvas encontram ótimas condições para o seu crescimento.

Êsse conjunto de circunstâncias, associado às precárias condições econômico-sociais das populações da Região em estudo, explicam os dados obtidos pelo Inquérito Helmintológico Escolar. As maiores percentagens de resultados positivos localizam-se no vale do Parnaíba e nas zonas vizinhas da Amazônia, onde as chuvas abundantes distribuem-se pelo ano todo, e onde se apresentam solos de aluviões.

A prevalência da verminose no Município de São Luís (51,92%) devido ao fator urbanização, contrasta com a observada no restante da Zona do Litoral do Maranhão (77,47%). Na Baixada e no Gurupi, mais de 80% da população escolar encontravam-se eliminando ovos de ancilostomídeos, por ocasião do Inquérito Helmintológico Escolar. Os mais baixos índices foram obtidos no Sertão do Piauí que, mesmo assim, apresentava 53,34% dos exames com resultado positivo.

Região Nordeste

A incidência da ancilostomose no Nordeste está ligada à distribuição da pluviosidade. As áreas mais bem regadas são as litorâneas, de um modo geral, e caracterizam-se por apresentar uma estação sêca relativamente bem definida, atingindo em alguns trechos cêrca de 6 meses [3]. Durante essa parte do ano, os ovos e as larvas dos ancilostomídeos não encontram condições favoráveis para se desenvolverem no solo, razão pela qual devem ser escassas, nessa época, as infestações ou reinfestações.

Como a maioria dos vermes albergados pelas pessoas têm vida limitada a alguns meses, dando-se espontâneamente a expulsão dos mais velhos ou dos que apresentam menor vitalidade, a carga parasitária depende sempre de novas infestações. Quando êsse fato não ocorre contìnuamente, reduz-se o número de parasitos e de ovos eliminados nas fezes dos pacientes, diminui a contaminação do solo e conseguintemente as probabilidades de transmissão.

Os solos compactos de grande extensão da Zona do Litoral e Mata, resultantes da decomposição das rochas cristalinas submetidas a um clima quente e úmido, e que constituem em algumas áreas o "massapê", representam um fator atenuante à disseminação da verminose. Essa é uma das razões porque não se encontram na planície litorânea da Região Nordeste índices tão elevados quanto no Meio Norte, onde as condições de desenvolvimento dos vermes, no meio exterior, são muito mais favoráveis (v. Mapa e Quadro V).

A parte meridional do Litoral de Pernambuco é considerada das mais úmidas (Am na classificação de KÖPPEN). Caem mais de 2.000 mm anuais de chuvas e a estação sêca é curta, chegando a atingir apenas 90 dias. Apesar disso, a infestação é mais baixa que no Agreste do mesmo Estado, onde a pluviosidade varia em tôrno de 600 a 900 mm. Nesse contraste influem os seguintes fatôres:

1.°) No Litoral do Nordeste há um grande número de cidades, principalmente as capitais dos Estados, onde a condição urbana melhora a situação sanitária da população através da instalação do abastecimento de água, rêde de esgotos, etc. Os inquéritos parasitológicos, sempre que incluam áreas urbanizadas, onde também devido às facilidades, é maior o número de pessoas examinadas, tendem a fornecer índices de positividades mais baixos que os de áreas predominantemente rurais, com iguais condições geográficas.

2.°) O Agreste apresenta pontos de maior umidade, tais como as zonas de cabeceiras; os vales cuja orientação possibilita a penetração dos ventos úmidos do oceano (brejos de vales); ou mesmo as maiores altitudes, condicionando a existência de brejos de altitude [27]. Nestas últimas, as temperaturas mais baixas ocasionam a precipitação da umidade trazida pelos ventos, que não foi condensada no litoral. De um modo geral, as aglomerações humanas estão situadas nesses pontos ou utilizam-nos para a agricultura. Tendo sido o Inquérito Helmintológico Escolar realizado nessas localidades, o resultado foi a obtenção de elevado índice na Zona.

No Estado da Paraíba, na Zona da Borborema Central, onde o clima é acentuadamente semi-árido, encontra-se um dos mais baixos índices de infestação por ancilostomídeos, de todo o Nordeste (6,22%).

Na Zona do Brejo da Paraíba, ao contrário, havendo maior umidade, oriunda do relêvo e da posição, cresce êsse índice, sendo mesmo quase equivalente ao do Litoral.

No Ceará, em meio ao Sertão semi-árido com fraca incidência da doença, elevam-se as chapadas, de solo sedimentar permeável, que retêm a umidade, possibilitando grande infestação. As cidades e vilas, localizando-se nos vales onde se desenvolvem as atividades agrícolas, beneficiadas pela presença da água, englobam todos os elementos do complexo patogênico da ancilostomose. Na cidade de Araripe, situada no sopé da Chapada, existiam por ocasião do Inquérito Helmintológico Escolar, mais de 60% da população de 7 a 14 anos eliminando ovos de ancilóstomo.

No Rio Grande do Norte, a incidência diminui do Litoral e Mata para o Sertão, seguindo a regra geral de variação da altura e regime das chuvas. Nesse Estado, como no de Alagoas, é a urbanização que faz baixar a incidência da verminose no litoral.

A Zona Salineira do Rio Grande do Norte, ainda que situada no Litoral dêsse Estado, apresenta pouca pluviosidade devido, parece, à direção da costa, que aí é Leste-Oeste [23]. Esta parte do litoral sofre uma estação sêca bem acentuada, estando compreendida no clima BShw [20]. O índice de infestação por ancilostomídeos na população escolar é baixo, constatando-se nos exemplos do Quadro I.

QUADRO I

Quantidade de chuvas em três cidades da Zona Salineira (Rio Grande do Norte) e respectivas taxas de ancilostomose

Localidades	Precipitação anual em mm	Prevalência de ancilostomose em crianças (%)
Macau	476,6	18,43
Açu	606,0	20,79
Areia Branca	615,0	28,15

No Estado de Alagoas a faixa de clima úmido é muito larga, acentuada ainda pelo amplo vale do São Francisco, que permite a passagem dos alíseos de SE, os quais vão causar precipitação no interior. Os índices mais baixos da doença coincidem com o Sertão do São Francisco, onde, em Pão de Açúcar, com uma pluviosidade de 719,2 mm, atingem 34,21% de escolares.

Em Sergipe, os índices são elevados, culminando na Zona Central com 72,27%. Nessa Zona [24], a densidade demográfica é muito alta, variando (em 1950) entre 40 e 100 hab/km^2. Essa aglomeração contribui para acentuar a infestação, pois, havendo grande número de habitantes em determinada área, a poluição do solo é maior e as possibilidades de contato das larvas com os indivíduos também crescem. O clima é bastante úmido e os solos são, na sua maio-

ria, resultantes da decomposição do calcário, alcalinos portanto.

Na Zona do Sertão do São Francisco, nesse Estado, bem como na do Baixo São Francisco, os centros populacionais concentram-se ao longo do rio, predominando as atividades agrícolas, aproveitando a umidade da zona litorânea que aí consegue chegar mais para o interior, através do vale. Essas áreas úmidas, preferidas pelos habitantes para suas atividades agropecuárias, apresentavam mais de 65% da população escolar com ancilostomose.

No Litoral da Bahia faz-se a transição do tipo de clima úmido, com estação sêca pronunciada, para o sempre úmido que se estende por tôda a costa meridional do Estado [4]. A incidência nessa parte do litoral é mais elevada que ao norte. No Recôncavo temos que considerar a influência da urbanização, apesar dos elementos climáticos favoráveis à alta incidência. Se estabelecemos os índices de infestação dessa Zona excluindo as cidades do Salvador, de Santo Amaro, Nazaré e Cachoeira, cujas populações excediam de 10.000 habitantes por ocasião do Inquérito, teremos um índice de valor muito mais elevado, passando de 45,50% com a inclusão das cidades, para 61,25% sem elas. Confirma-se mais uma vez que o nível econômico elevado das populações da área urbana, associado aos melhoramentos decorrentes de maior acumulação de recursos, neutraliza as condições insalubres do meio físico, refletindo-se no estado sanitário dos habitantes.

GRANDE REGIÃO LESTE

Existe nessa Região grande influência da distribuição dos elementos do clima sôbre a incidência da ancilostomose na população (Quadro VI). De um modo geral, os índices de infestação são elevados, diminuindo do litoral para o interior, à medida que baixa a pluviosidade e acentua-se a estação sêca. Outro fator que aqui tem importância é a altitude. Registrando-se, nessa parte do território brasileiro, a transição dos climas quentes para o tropical de altitude (mesotérmico), aparecem temperaturas mais baixas [22]. Êsse tipo de clima vai predominar nas serras (do Mar, Mantiqueira e Espinhaço) e nos níveis mais altos dos planaltos e chapadões, determinando temperaturas médias, no mês mais frio, inferiores a 18°C. Tal situação térmica, desfavorável para o desenvolvimento dos ovos e larvas de ancilostomídeos no solo, faz baixar os índices de infestação.

No trecho litorâneo, a pluviosidade é elevada o ano todo (cêrca de 2.000 mm) e a temperatura mantém-se sempre alta, condicionando grande incidência da helmintose. Em algumas Zonas aí compreendidas, como a Cacaueira, do Extremo Sul da Bahia ou da encosta da serra no Rio de Janeiro e Espírito Santo, mais de 60% da população escolar tinha ancilostomose.

Em Cabo Frio, as precipitações diminuem para 853,9 mm anuais, em virtude de sua situação no limite da zona da influência da massa de ar convectivamente instável e da tropical atlântica [5] e a incidência era de apenas 24,91%.

Nas áreas econômicamente mais desenvolvidas, assume grande importância nas avaliações estatísticas a influência decorrente da participação de zonas urbanas no inquérito.

As regiões mais salubres, do ponto de vista da ancilostomose, são as seguintes:

1 — A Zona Sul de Minas Gerais, onde influem a altitude e as condições de saneamento, pois essa região é uma das econômicamente mais favorecidas do País. Do ponto de vista da pluviosidade, estando classificada no tipo Cwb (KÖPPEN), apresenta estação sêca no inverno, o que contribui ainda mais para a baixa incidência da ancilostomose, que aí não atingia 34% da população.

2 — A Zona Metalúrgica, onde estão localizadas numerosas cidades, incluindo Belo Horizonte, Sabará, Ouro Prêto, Conselheiro Lafaiete, Barbacena, etc.; o índice de infestação é de 24,29%. Também aí o clima é mesotérmico, com estação sêca. Apesar disso, se retirarmos os valores relativos às cidades importantes, verificamos que o índice de infestação irá subir, levando à conclusão de que são principalmente os fatôres do meio social que atenuam as condições de insalubridade.

3 — É mais evidente ainda a influência do desenvolvimento econômico em algumas áreas do Estado do Rio de Janeiro, como as Zonas da Baixada da Guanabara, Resende e Alto da Serra, onde a incidência é baixa. Nas duas primeiras, a umidade é grande e não há, como no Alto da Serra, o fator altitude, melhorando ainda mais a situação sanitária dos Municípios aí situados.

Os índices de infestação por ancilostomídeos obtidos, estão expostos no Quadro II.

QUADRO II

Ancilostomose em diversas Zonas do Estado do Rio de Janeiro

Localidades	Escolares com ancilostomose (%)
Zona da Baixada da Guanabara	23,16
Zona de Resende	25,18
Zona do Alto da Serra	15,67

Em Petrópolis e Teresópolis, onde foram encontrados os índices de ancilostomose mais baixos de todo o Estado do Rio de Janeiro (respectivamente 11,55 e 9,93%), as precipitações ultrapassam 2.000 mm anuais e não há, pràticamente, estação sêca. A altitude em que estão situadas, a primeira cidade a 850 e a segunda a 877 m, condiciona temperaturas de 18°C, e inferiores a êste valor, durante grande parte do ano (de abril a outubro). Êsse fato, aliado à extensão da área urbana incluída nesses Municípios, é que é responsável pela pequena infestação da população.

O litoral Norte de São Paulo é caracterizado por uma das mais altas incidências. Doria [16], em 1936, examinando escolares, observou mais de 90% com ancilostomose, em São Sebastião e Vila Bela. Êsses dados coincidem com os registrados por Pessôa & Pascale [37] em 1941. A escarpa da Serra do Mar, aí bastante elevada, aproxima-se o máximo do oceano, determinando chuvas abundantes, que ultrapassam 2.500 mm anuais e distribuem-se regularmente. É a êsse fator, aliado às condições econômicas precárias, que se deve tão alta endemicidade.

GRANDE REGIÃO SUL

De um modo geral, a distribuição da ancilostomose nessa Região está ligada aos tipos de clima aí compreendidos (Quadro VII).

No Estado de São Paulo, a parte setentrional do planalto apresenta clima tropical, com temperaturas médias anuais superiores a 22°C e chuvas abundantes distribuídas nos meses de verão [22, 40]. O parasitismo aí é elevado, como podemos comprovar pelos resultados obtidos na Zona de Rio Prêto (63,5%).

Quanto ao litoral dêsse Estado, compreendido na Região Sul, para o qual não possuímos dados de incidência da doença, é também caracterizado por um clima tropical, com chuvas abundantes, regularmente distribuídas.

Com exceção dêstes dois trechos, a totalidade da Região está incluída no clima mesotérmico, cujas temperaturas médias anuais são inferiores a 22°C. No Estado de São Paulo, a distribuição das chuvas é caracterizada pela existência de estação sêca e verões quentes (tipo Cwa). O inquérito de Araraquara [18], Município situado nessa zona climática, acusou uma incidência de 59,8% de exames positivos.

Na Cidade de São Paulo, cujo clima é mesotérmico, com estiagem no inverno e verões frescos (Cwb), foram efetuados vários inquéritos. Pessôa & Lucena [36] examinando escolares de Santo Amaro, em 1938, acharam 52% infestados; entre escolares da Capital, Cardoso & Carvalho (1944) [6] registraram 23,35% e Corrêa *et al.* (1954) [10], em 55.764 exames, 21,54% positivos. Êstes índices mostram nitidamente o contraste entre a população de uma grande cidade e a de uma localidade pouco urbanizada (como Santo Amaro, em 1938), na mesma área. As diferenças entre cidades, vilas e zona rural também aparecem no inquérito de Araraquara (Quadro III).

QUADRO III

Positividade para ancilostomídeos, no inquérito de Araraquara, sôbre todos os grupos etários, segundo a residência (GALVÃO, 1953)

Áreas	Positividade (%)
Cidade	23,9
Vilas	38,0
Zona rural	67,5
Município	46,9

O inquérito da Comissão Rockefeller (1921) forneceu como número global para o Estado de São Paulo a taxa de 58,9% de positivos para ancilostomídeos, sôbre 8.500 exames realizados. HACKETT [21] (da referida Comissão) comentava ser bastante elevada a prevalência da ancilostomose nas zonas cafeeiras do oeste do Estado de São Paulo.

Nos Estados mais meridionais, distinguimos dois tipos climáticos. Ambos mesotérmicos, com temperaturas médias anuais inferiores a 22°C, chuvas regularmente distribuídas, diferenciam-se pelas temperaturas dos meses de verão. No litoral, os verões são quentes, embora a média do mês mais frio seja inferior a 18°C (Cfa). O Litoral do Paraná é que apresenta maior pluviosidade (mais de 3.000 mm), determinada pela escarpa do planalto, aí bem elevada, que promove chuvas de relêvo. A incidência da ancilostomose é superior a 40%. Em Santa Catarina, devido às menores altitudes da Serra do Mar, essas características climáticas se estendem à bacia do Itajaí, atingindo as localidades desta zona mais de 50% de positividade nos exames de fezes, bem como no Litoral de Laguna. Mesmo o Estado do Rio Grande do Sul, possui alta infestação nos Municípios litorâneos (55%).

Fora do litoral, vamos encontrar índices semelhantes a êsses nas Zonas do Norte do Paraná e Oeste, que participam do mesmo tipo climático.

As zonas de maiores altitudes e mais meridionais do planalto possuem temperaturas baixas no inverno, constituindo o tipo climático Cfb de KÖPPEN, onde não são raros os dias de geadas [45]. Essas condições, incompatíveis com a evolução dos ovos e larvas dos ancilostomídeos no solo, têm como resultado incidência pequena da doença, com índices comparáveis aos do Nordeste semiárido. Na Zona de Curitiba, foram encontrados 7,8% de resultados positivos, mantendo-se nessa cidade a temperatura média abaixo de 18°C durante os meses de abril a outubro. Na Zona dos Campos Gerais, no Paraná, e dos Campos de Vacaria, no Rio Grande do Sul, o índice foi de 8% apenas.

Concluímos, portanto, que a incidência elevada é função das altas temperaturas da zona litorânea, fato já assinalado por SOUZA ARAUJO [2].

GRANDE REGIÃO CENTRO-OESTE

Abrange a quase totalidade dos Estados de Mato Grosso e Goiás, parte do Maranhão, do Piauí, da Bahia e de Minas Gerais.

Do ponto de vista da distribuição da incidência da ancilostomose, não há caracterização nítida das duas grandes unidades do relêvo, aí compreendidas, como sejam o Planalto e a Baixada do Paraguai (Quadro VIII).

As médias anuais de temperatura elevam-se de um modo geral de SE para NW, como conseqüência da latitude e da altitude. Na altura do paralelo de 18°S êsse aumento se faz de leste para oeste, caracterizando a variação de altitude do planalto para o pantanal [22].

Excepcionalmente, vamos encontrar temperaturas médias inferiores a 20°C a sudeste da Região, principalmente no Triângulo Mineiro, onde a altitude ultrapassa 1.000 m e a latitude é mais alta (Araxá 19°,8C e Patos de Minas 19°,9C). Ao norte dêsse trecho, a latitude baixa condiciona temperaturas médias elevadas, superiores a 21°C, mesmos nas cotas superiores a 1.000 m.

Nos meses de inverno ocorrem diminuições bruscas de temperatura, decorrentes da penetração da massa de ar polar, no sul de Mato Grosso e no planalto goiano. Êsse fenômeno é entretanto de precária duração (alguns dias) e, embora atinja alguns valores absolutos muito baixos (em Três Lagoas registrou-se 0,8°C em 29-6-1918) [22], nas médias não se registram grandes diferenças

e a amplitude térmica anual mantém-se pequena.

Quanto à pluviosidade, caracteriza-se por concentrar-se nos meses de verão, caindo de 1.000 a 2.000 mm em média. As menores quantidades de chuvas registram-se nas altitudes menos elevadas, como na baixada do Paraguai e no vale do Paraná. Mais de 80% das chuvas caem nos meses de verão, tendo sido registradas quantidades mensais de 60 mm, na estação sêca.

Êsses elementos do clima influem na distribuição da ancilostomose que, de um modo geral, é muito incidente. Não existem aqui os grandes máximos de infestação de outras Regiões já estudadas, devido principalmente à estação sêca que caracteriza a pluviometria. Também não se encontram taxas muito reduzidas, pois a altitude é compensada pela latitude, não se registrando longos períodos de temperaturas baixas, bastante desfavoráveis ao desenvolvimento das larvas.

Os índices razoàvelmente elevados denunciam a precária situação sanitária, reflexo do menor desenvolvimento econômico.

Alguns índices indicam a influência da área urbana, sem o destaque de outras Regiões já estudadas.

Em Goiânia, há grande contraste com outros Municípios da Zona em que está situada. Enquanto êsse Município apresenta uma incidência de 31,67%, a Zona, excluindo-o, possui 50,10%.

As maiores infestações foram encontradas na Encosta Sul (65,89%), onde Aquidauana recebe mais de 1.500 mm anuais de chuvas.

Nas partes altas do planalto, como, por exemplo, no Triângulo Mineiro ou no Alto Paranaíba, a incidência é superior a 45% comprovando a pequena influência da altitude.

SUMMARY

Geographic conditions of ancylostomiasis distribution in Brazil.

Incidence of ancylostomiasis in Brazil bears close relationship with climate. As a rule, infection rates are high, the more frequent usually ranging from 40 to 60%. This fact is justified by the high temperatures proper to a tropical country; by the heavy rains wich fall over almost whole of Brazil, and also by the poor sanitary conditions, which are found especially in the rural areas but also in villages, little towns and the outskirts of great cities.

Some areas are to be noted on account of the high incidence, being foremost the plains and coastal lowlands: this is due to the high thermal averages as well as to the heavy and regular rains caused by the humidity — bearing winds coming from the ocean. There, the importance of ancylostomiasis as a public health problem is increased due to the fact that such areas are those of highest demographic density in Brazil.

The highest rates (more than 80%) correspond to the State of Maranhão, the Bragantine Zone (Pará) and, generally, the coast of the State of São Paulo, where the most favorable factors coincide.

Excepting the maritime border, high infection rates are to be observed only at the easter slope of the Central Plateau, in Bahia, the southern slope, in Mato Grosso, and the hinterland of São Paulo (Ribeirão Prêto, Bauru and Rio Prêto, as far as it is known at present).

Infection rates of less than 40% are to be observed especially at the Lower Amazon and islands; the Plateau Zone, in Goiás; the Metallurgic Zone in Minas Gerais; and the Mountain Zone peaks, in the State of Rio de Janeiro.

The lowest infection rates are found in the semiarid Northeast, and in areas of higher altitude on the Meridional Plateau, where the mesothermic climate, with low temperatures in the winter months, does not favour the evolution of larvae in the soil.

Some urbanized areas, even when localized in regions of high incidence of ancylostomiasis, present a very low infection index, in spite of the favorable conditions of the physical environment, thus showing that the sanitary state of populations depends, above everything else, on their economic and social patterns.

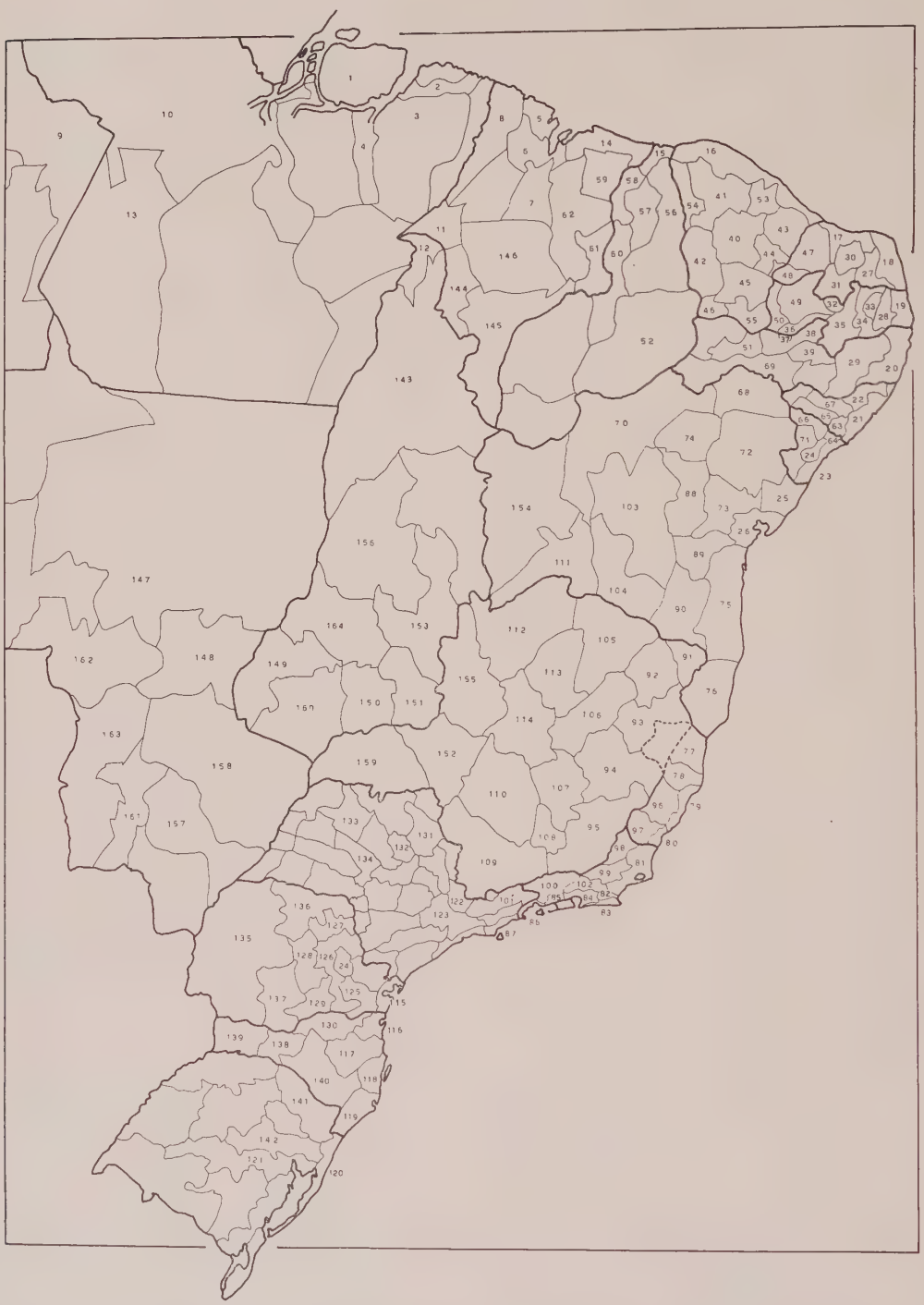
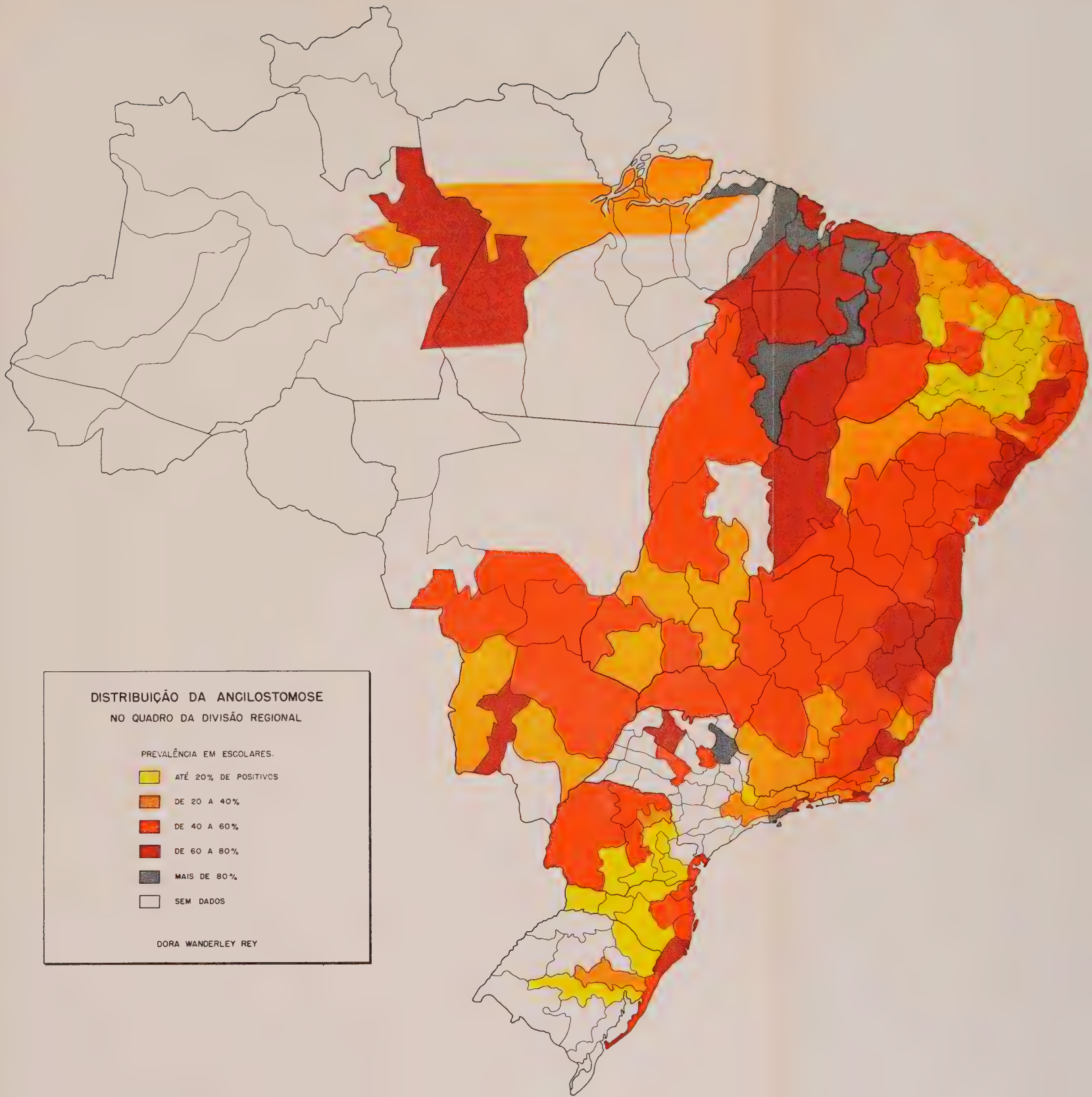


Fig. 1 — Divisão regional do Brasil. As zonas numeradas são aquelas para as quais há informações sôbre a prevalência da ancilostomose entre os escolares. Os números correspondem aos que precedem os nomes das zonas nos Quadros IV a VIII.


DISTRIBUIÇÃO DA ANCILOSTOMOSE
NO QUADRO DA DIVISÃO REGIONAL
PREVALÊNCIA EM ESCOLARES.
ATÉ 20% DE POSITIVOS
DE 20 A 40%
DE 40 A 60%
DE 60 A 80%
MAIS DE 80%
SEM DADOS
DORA WANDERLEY REY

QUADRO IV

Grande Região Norte

Zonas geográficas em que há informação sôbre a incidência da ancilostomose. Exames abrangendo a população escolar ou o grupo etário de 7 a 14 anos.

REGIÕES Sub-Regiões Zonas Geográficas	Unidade Federada	Nº de exames feitos	Exames positivos	
			Nº	%
PLANÍCIE LITORÂNEA				
Marajó e Ilhas				
1. Marajó e Ilhas	Pará	102	27	26,5
Leste Paraense				
2. Bragantina	Pará	6.446	4.306	66,77
3. Guajarina	Pará	239	84	35,1
4. Tocantina	Pará	174	67	38,0
Baixada Maranhense				
5. Litoral Norte	Maranhão	5.344	2.971	55,59
6. Baixada	Maranhão	1.450	1.193	82,27
7. Baixo Mearim	Maranhão	1.382	1.044	75,54
8. Gurupi	Maranhão	131	106	80,91
PLANÍCIE AMAZÔNICA				
Rio Amazonas				
9. Médio Amazonas	Amazonas	261	156	60,0
10. Baixo Amazonas	Pará	106	35	33,0
ENCOSTA SETENTRIONAL				
Xingu-Tocantins				
11. Tocantins	Maranhão	353	277	77,37
12. Araguaia-Tocantins	Goiás	89	47	52,80
Alto Madeira-Tapajós				
13. Tapajós	Pará	413	281	68,0

QUADRO V

Grande Região Nordeste — Meio Norte e Nordeste

Zonas geográficas em que há informação sôbre a incidência da ancilostomose. Exames abrangendo a população escolar ou o grupo etário de 7 a 14 anos.

REGIÕES SUB-REGIÕES Zonas Geográficas	Unidade Federada	Nº de exames feitos	Exames positivos	
			Nº	%
LITORAL NORTE				
LITORAL NORTE				
14. Litoral Nordeste	Maranhão	790	590	74,68
15. Litoral	Piauí	2.199	1.130	71,88
16. Litoral	Ceará	18.812	9.468	50,33
LITORAL E ENCOSTA				
LITORAL E MATA				
17. Salineira ou Litoral e Salinas.	R. G. Norte	1.210	265	21,90
18. Litoral	R. G. Norte	9.335	4.575	49,00
19. Litoral e Mata	Paraíba	9.533	3.430	45,65
20. Litoral e Mata	Pernambuco	34.903	16.391	46,96
21. Litoral	Alagoas	9.876	4.607	46,64
22. Mata	Alagoas	2.055	1.123	54,64
23. Litoral	Sergipe	7.832	5.014	64,01
24. Central	Sergipe	2.838	2.051	72,27
25. Litoral Norte	Bahia	2.441	1.484	60,79
26. Recôncavo	Bahia	32.564	14.785	45,40
AGRESTE				
27. Agreste	R. G. Norte	2.346	866	36,91
28. Agreste e Caatinga Litorânea.	Paraíba	2.963	1.350	45,56
29. Agreste	Pernambuco	12.919	7.798	60,36
SEMI-ÁRIDA				
SERTÃO SEMI-ÁRIDO OU HIPERXERÓFITO				
30. Centro-Norte	R. G. Norte	596	100	16,78
31. Seridó	R. G. Norte	2.585	319	12,34
32. Seridó	Paraíba	212	12	5,66
BORBOREMA				
33. Brejo Paraibano	Paraíba	1.882	784	41,65
34. Borborema Oriental	Paraíba	3.930	841	21,39
35. Borborema Central	Paraíba	819	51	6,22
36. Sertão Alto	Paraíba	363	57	15,70
37. Triunfo	Pernambuco	218	29	13,30
38. Sertão do Alto Pajeú	Pernambuco	573	33	5,75
39. Sertão do Alto Moxotó	Pernambuco	900	105	11,67
SERTÃO INTERIOR OU SERTÃO HIPOXERÓFITO				
40. Sertão Central	Ceará	1.799	575	31,96
41. Sertão Centro-Norte	Ceará	3.952	1.008	25,50
42. Sertão do Sudoeste	Ceará	1.063	165	15,52
43. Sertão do Baixo Jaguaribe	Ceará	585	177	30,26
44. Sertão do Médio Jaguaribe	Ceará	410	81	19,75
45. Sertão do Salgado e Alto Jaguaribe	Ceará	2.754	1.451	52,68
46. Araripe	Ceará	1.181	637	53,94

QUADRO V (*continuação*)

REGIÕES Sub-Regiões Zonas Geográficas	Unidade Federada	Nº de exames feitos	Exames positivos	
			Nº	%
47. Chapada do Apodi	R. G. Norte	1.085	211	19,44
48. Serrana	R. G. Norte	1.417	242	17,07
49. Sertão do Piranhas	Paraíba	2.204	140	6,35
50. Sertão do Oeste	Paraíba	1.602	136	8,48
51. Sertão Central	Pernambuco	214	10	4,67
52. Sertão	Piauí	958	511	53,34
Serras Cearenses				
53. Baturité	Ceará	2.480	1.352	54,51
54. Ibiapaba	Ceará	1.135	360	31,71
Cariri Cearense				
55. Cariri	Ceará	5.818	3.210	55,17
CAMPOS E PALMEIRAS OU CAMPOS E COCAIS				
Encosta da Ibiapaba				
56. Ibiapaba	Piauí	394	249	63,20
57. Carnaúba	Piauí	1.052	689	65,49
Baixo Parnaíba				
58. Baixo Parnaíba	Piauí	172	147	85,46
59. Baixo Parnaíba	Maranhão	303	256	84,48
Médio Parnaíba				
60. Médio Parnaíba	Piauí	6.272	4.561	72,72
61. Médio Parnaíba	Maranhão	180	152	84,44
Itapecuru				
62. Itapecuru	Maranhão	2.214	1.645	74,29
DEPRESSÃO SANFRANCISCANA				
Baixo São Francisco				
63. Baixo São Francisco	Alagoas	1.685	988	58,63
64. Baixo São Francisco	Sergipe	1.285	835	64,98
65. Sertão do São Francisco	Alagoas	228	78	34,21
66. Sertão do São Francisco	Sergipe	510	337	66,07
67. Sertaneja	Alagoas	1.121	542	48,34
Sertão do São Francisco				
68. Sertão do São Francisco	Bahia	404	114	28,22
69. Sertão do São Francisco	Pernambuco	483	93	19,25
Médio São Francisco				
70. Baixo Médio São Francisco	Bahia	1.446	534	36,93
SERTÃO BAIANO				
Sertão Baiano				
71. Oeste	Sergipe	2.211	1.527	69,06
72. Nordeste	Bahia	6.344	3.482	54,88
73. Feira de Santana	Bahia	5.252	2.667	50,78
74. Senhor do Bonfim	Bahia	3.026	1.376	45,47

QUADRO VI

Grande Região Leste

Zonas geográficas em que há informação sôbre a incidência da ancilostomose. Exames abrangendo a população escolar ou o grupo etário de 7 a 14 anos.

REGIÕES Sub-Regiões Zonas Geográficas	Unidade Federada	Nº de exames feitos	Exames positivos	
			Nº	%
LITORAL				
Baixada Norte				
75. Cacaueira	Bahia	5.832	3.655	62,67
76. Extremo Sul	Bahia	974	650	66,73
77. Norte	Espírito Santo	270	143	52,96
78. Baixo Rio Doce	Espírito Santo	621	338	54,42
Baixada Centro Litorânea				
79. Vitória	Espírito Santo	6.534	3.244	49,64
80. Itapemirim	Espírito Santo	238	147	61,76
81. Baixada de Goitacases	Rio de Janeiro	7.101	2.771	39,10
82. Baixada do Rio São João	Rio de Janeiro	114	69	60,52
83. Baixada de Araruama	Rio de Janeiro	2.292	943	41,14
84. Baixada da Guanabara	Rio de Janeiro	24.484	5.670	23,16
85. Baixada do Rio Guandu	Rio de Janeiro	3.808	981	25,76
Litoral Sul				
86. Litoral da Baia da Ilha Grande	Rio de Janeiro	942	477	43,61
87. Litoral de São Sebastião	São Paulo	1.284	1.205	94,60
ENCOSTA				
Encosta Nordeste				
88. Encosta da Chapada Diamantina	Bahia	2.882	1.257	43,61
89. Jequié	Bahia	3.437	1.812	52,72
90. Conquista	Bahia	2.882	1.410	48,92
91. Médio Baixo Jequitinhonha	Minas Gerais			
92. Médio Jequitinhonha	Minas Gerais	6.580	4.242	64,47
93. Mucuri	Minas Gerais			
Mata				
94. Rio Doce	Minas Gerais	5.118	3.015	58,90
95. Mata	Minas Gerais	24.464	12.056	49,28
96. Serrana do Centro	Espírito Santo	1.686	446	26,45
97. Serrana do Sul	Espírito Santo	4.473	2.976	66,53
98. Muriaé	Rio de Janeiro	3.514	2.113	60,13
99. Cantagalo	Rio de Janeiro	1.539	723	46,97
100. Resende	Rio de Janeiro	9.951	2.506	25,18
101. Médio Paraíba	São Paulo	1.407	400	28,43
Serra do Mar				
102. Alto da Serra	Rio de Janeiro	6.156	965	15,67
PLANALTO				
Espinhaço				
103. Chapada Diamantina	Bahia	2.013	898	44,61
104. Serra Geral	Bahia	2.319	1.363	58,77
105. Itacambira	Minas Gerais	824	428	51,94

QUADRO VI (*continuação*)

REGIÕES Sub-Regiões Zonas Geográficas	Unidade Federada	Nº de exames feitos	Exames positivos	
			Nº	%
106. Alto Jequitinhonha	Minas Gerais	3.060	1.526	49,86
107. Metalúrgica	Minas Gerais	40.096	9.742	24,29
Maciço da Mantiqueira				
108. Campos da Mantiqueira Mineira	Minas Gerais	5.332	1.332	24,98
109. Sul	Minas Gerais	34.054	11.535	33,87
Planalto das Vertentes				
110. Oeste	Minas Gerais	16.221	8.982	55,37
DEPRESSÃO SANFRANCISCANA				
Depressão Sanfranciscana do Norte				
111. Médio São Francisco	Bahia	1.536	860	55,98
Depressão Sanfranciscana do Sul				
112. Alto Médio São Francisco	Minas Gerais			
113. Montes Claros	Minas Gerais	4.019	2.301	57,25
114. Alto São Francisco	Minas Gerais	2.435	1.192	48,95

QUADRO VII

Grande Região Sul

Zonas geográficas em que há informação sôbre a incidência da ancilostomose. Exames abrangendo a população escolar ou o grupo etário de 7 a 14 anos.

REGIÕES Sub-Regiões Zonas Geográficas	Unidade Federada	Nº de exames feitos	Exames positivos	
			Nº	%
LITORAL E ENCOSTA				
Baixada Litorânea				
115. Litoral	Paraná	1.697	680	40,07
116. Litoral de São Francisco	Santa Catarina	3.048	1.831	60,07
Bacia do Itajaí				
117. Bacia do Itajaí	Santa Catarina	5.084	2.543	50,02
Litoral de Florianópolis				
118. Florianópolis	Santa Catarina	6.153	3.147	51,14
Litoral de Laguna				
119. Laguna	Santa Catarina	4.134	2.535	61,32
Litoral Lacustre				
120. Litoral	R. Grande Sul	982	547	55,70
CAMPOS MERIDIONAIS				
Depressão Central				
121. Depressão Central	R. Grande Sul	2.468	332	13,45

QUADRO VII (*continuação*)

REGIÕES Sub-Regiões Zonas Geográficas	Unidade Federada	Nº de exames feitos	Exames positivos	
			Nº	%
PLANALTO CRISTALINO				
Mantiqueira				
122. Bragança	São Paulo	112	11	10,00
Planalto Atlântico				
123. São Paulo	São Paulo	55.764	12.014	21,54
Alto Ribeira				
124. Castro	Paraná	1.005	88	8,75
125. Curitiba	Paraná	10.577	866	8,19
SEDIMENTAR PALEOZÓICA				
Campos Gerais				
126. Campos Gerais	Paraná	4.222	348	8,24
Vale do Itararé				
127. Tomasina	Paraná	2.327	776	33,34
Ervais				
128. Alto Ivaí	Paraná	2.695	1.162	43,11
129. Irati	Paraná	2.380	222	9,33
130. Canoinhas	Santa Catarina	2.915	460	15,78
PLANALTO OCIDENTAL				
Alto Planalto				
131. Ribeirão Prêto	São Paulo	503	412	81,90
132. Araraquara	São Paulo	1.673	1.000	59,77
Médio Planalto				
133. Rio Prêto	São Paulo	4.842	3.075	63,51
134. Bauru	São Paulo	2.879	1.614	56,06
Vale do Paraná				
135. Oeste	Paraná	11.287	4.910	43,50
Norte do Paraná				
136. Norte do Paraná	Paraná	17.040	7.599	44,59
Campos do Oeste				
137. Campos do Oeste	Paraná	589	27	4,58
Alto Uruguai				
138. Rio do Peixe	Santa Catarina	2.626	322	12,26
139. Oeste	Santa Catarina	874	162	18,53
Campos do Planalto Meridional				
140. Campos de Lajes	Santa Catarina	1.349	108	8,00
141. Campos de Cima da Serra	R. Grande Sul	261	23	8,81
ENCOSTA RIOGRANDENSE				
Encosta Inferior				
142. Encosta inferior do Nordeste.	R. Grande Sul	1.865	552	27,98

QUADRO VIII

Grande Região Centro-Oeste

Zonas geográficas em que há informação sôbre a incidência da ancilostomose. Exames abrangendo a população escolar ou o grupo etário de 7 a 14 anos.

REGIÕES SUB-REGIÕES Zonas Geográficas	Unidade Federada	Nº de exames feitos	Exames positivos	
			Nº	%
MEIO NORTE				
MEIO NORTE				
143. Norte Goiana	Goiás	654	344	57,25
144. Carolina	Maranhão	358	277	77,37
ALTO PARNAÍBA				
145. Alto Parnaíba	Maranhão	152	132	86,84
146. Alto Mearim	Maranhão	412	291	70,63
CHAPADÕES				
CHAPADA MATOGROSSENSE				
147. Chapada	Mato Grosso	3.414	1.562	45,75
148. Poxoréu (Zona Leste)	Mato Grosso	649	327	50,38
PLANALTO DE CAIAPÓ				
149. Alto Araguaia	Goiás	656	329	50,15
PENEPLANO DO ALTO PARANAÍBA				
SUL GOIANO				
150. Meia Ponte	Goiás	1.781	863	48,46
151. Ipameri	Goiás	2.166	858	39,61
ALTO PARANAÍBA				
152. Alto Paranaíba	Minas Gerais	9.004	4.034	44,80
PLANALTO CENTRAL				
PLANALTO CENTRAL				
153. Planalto	Goiás	1.221	405	33,17
ENCOSTA ORIENTAL DO PLANALTO CENTRAL				
ENCOSTA NORTE				
154. Barreiras	Bahia	441	285	64,62
ENCOSTA SUL				
155. Urucuia	Minas Gerais	642	371	57,78
ARAGUAIA-TOCANTINS				
ALTO TOCANTINS				
156. Alto Tocantins	Goiás	268	159	59,32

QUADRO VIII (*continuação*)

REGIÕES Sub-Regiões Zonas Geográficas	Unidade Federada	Nº de exames feitos	Exames positivos	
			Nº	%
VERTENTE OCIDENTAL DO PARANÁ				
Campos e Ervais				
157. Campo Grande	Mato Grosso	4.080	1.631	39,97
Sudeste Matogrossense				
158. Rio Pardo (Zona Sudeste) ..	Mato Grosso	540	279	51,66
Médio Paranaíba				
159. Triângulo Mineiro	Minas Gerais	10.004	4.710	47,08
160. Rio Verde	Goiás	771	240	31,13
ENCOSTA E BAIXADA DO PARAGUAI				
Encosta				
161. Encosta Sul	Mato Grosso	1.554	1.024	65,89
Baixada				
162. Baixada Norte	Mato Grosso	1.013	592	58,44
163. Baixada Sul	Mato Grosso	1.249	462	36,99
MATO GROSSO DE GOIÁS				
Mato Grosso de Goiás				
164. Mato Grosso de Goiás	Goiás	6.988	2.685	38,42

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, F. F. M. de & LIMA, M. A. de — A baixada do Paraguai e o planalto centro-ocidental. Rio de Janeiro, I.B.G.E., 1959.
2. ARAUJO, H. C. de S. — As verminoses nas crianças do Paraná. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **17**:389-393, 1924.
3. BERNARDES, L. M. C. — Clima do Brasil. Bol. Geogr. **9**:727-739, 1951.
4. BERNARDES, L. M. C. — Os tipos de clima do Brasil. Bol. Geogr. **9**:988-1000, 1951.
5. BERNARDES, L. M. C. — Tipos de clima do Estado do Rio de Janeiro. Rev. brasil. geogr. **14**:57-80, 1952.
6. CARDOSO, F. A. & CARVALHO, P. — Incidência de verminose entre os matriculados no Centro de Saúde do Instituto de Higiene de São Paulo; apresentação estatística dos resultados de 10.000 exames de fezes. Bol. Inst. Hig. São Paulo (82), 1944.
7. CAUSEY, O. R.; COSTA, O. & CAUSEY, C. E. — Incidência de parasitos intestinais do homem em Belém, Pará, e vizinhança. Rev. SESP **1**:221-233, 1947.
8. CHANDLER, A. C. — Hookworm disease. New York, Macmillan, 1929.
9. CINTRA, J. F. & RUGAI, E. — Helmintíases entre escolares da cidade de Bauru. Rev. Inst. Adolfo Lutz **15**:155-157, 1955.
10. CORRÊA, M. O. A.; FLEURY, G. C.; DUARTE, Y. N. & BUENO, R. A. — Considerações sôbre alguns aspectos das helmintoses em nosso meio escolar. Rev. Inst. Adolfo Lutz **14**:27-32, 1954.
11. CORRÊA, M. O. A. & TAUNAY, A. E. — Incidência das verminoses e protozooses nos escolares da Capital. Rev. Inst. Adolfo Lutz **3**:247-260, 1943.
12. COSTA, O. R. — Contribuição ao conhecimento da esquistossomose na Amazônia. Rev. SESP **5**:401-409, 1952.

13. COSTA, O. R. — Incidência de parasitas intestinais em quatro cidades da Amazônia. Rev. SESP **1**:203-219, 1947.

14. COSTA, O. R.; AZEVEDO, M. C. & MAROJA, R. C. — Inquérito parasitológico entre crianças, realizado em seis municípios da Zona Bragantina, Estado do Pará, em 1950. Rev. SESP **8**:231-256, 1955.

15. CRUZ, W. O. — Aspectos sociais na profilaxia da anemia ancilostomótica. Ciência & Cultura **1**:171-182, 1949.

16. DORIA, A. de S. — A verminose no litoral norte do Estado; intensidade de infestação pela ancilostomose. Arq. Hig. & Saúde públ. **1**:89-100, 1936.

17. FOSTER, A. O. & CORT, W. W. — The effect of diet on hookworm infestation in dogs. Science **19**:681-683, 1931.

18. GALVÃO, A. L. A. — Estudos epidemiológicos sôbre enteroparasitoses em Araraquara. São Paulo, 1953. Tese Fac. Hig. & Saúde públ. Univ. São Paulo.

19. GONZAGA, A. G. — Climatologia e nosologia do Ceará. Rio de Janeiro, B. Souza, 1925.

20. GUERRA, I. A. L. T. — Tipos de clima do Nordeste. Rev. brasil. Geogr. **17**:449-496, 1955.

21. HACKETT, L. — Os cinco anos da Comissão Rockefeller no Brasil. Rev. médico-cir. Brasil **29**:336-349, 1921.

22. I.B.G.E. — Enciclopédia dos municípios brasileiros: vols. 1, 2, 3, 4, 6 e 10. Rio de Janeiro, I.B.G.E., 1957-1958.

23. I.B.G.E. — CONSELHO NACIONAL DE GEOGRAFIA — Divisão regional do Brasil. Rio de Janeiro, 1948/1950.

24. I.B.G.E. — CONSELHO NACIONAL DE GEOGRAFIA — Resolução nº 461 de 7 de julho de 1955. Bol. geogr. Rio de Janeiro **134**:543-563.

25. KÖPPEN, W. — Climatología. México, Fondo de cultura económica, 1948.

26. LARA, V. & CARVALHO, P. E. — Freqüência dos parasitas nas fezes das crianças do Centro de Saúde do Instituto de Higiene. São Paulo méd. **5**:341-362; **6**:435-472, 1936.

27. MELO, M. L. de — Paisagens do Nordeste em Pernambuco e Paraíba. Rio de Janeiro, Conselho Nacional de Geografia, 1958.

28. MERCER, J. H. — Pesquisa de *Strongyloides* na zona de Rio Preto. Rev. paulista Med. **39**:382-383, 1951.

29. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, SERVIÇO DE METEOROLOGIA. Normais climatológicas. Rio de Janeiro, Serviço de Informação Agrícola, 1941.

30. MONTENEGRO, L. — Incidência de protozoários e helmintos em Manaus. Rev. brasil. Med. **4**:266-268, 1947.

31. PASCALE, H. — Censo de verminoses no interior do Estado de São Paulo em 1947. Arq. Hig. & Saúde públ. **15**:3-14, 1950.

32. PAULA, H. de — Incidência de verminose em escolares. Brasil méd. **56**:271-272, 1942.

33. PELLON, A. B. & TEIXEIRA, I. — Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil. Rio de Janeiro, Divisão de Organização Sanitária, 1950.

34. PELLON, A. B. & TEIXEIRA, I. — O inquérito helmintológico escolar em cinco Estados das regiões Leste, Sul e Centro-Oeste. Trabalho apresentado ao 2º Congr. brasil. Hig., Curitiba, 1953.

35. PESSÔA, S. B. — Parasitologia Médica. 5ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara, 1958.

36. PESSÔA, S. B. & LUCENA, D. — Sôbre a disseminação de helmintoses nos habitantes de uma localidade saneada. Rev. Biol. & Hig. **9**:17-38, 1938.

37. PESSÔA, S. B. & PASCALE, H. — Pesquisas sôbre ancilostomose em São Paulo. IV. Análise da infestação pelo *Necator* em uma fazenda de café e cana no município de Sertãozinho. Arq. Hig. & Saúde públ. **6**: 38-60, 1941.

38. PESSÔA, S. B. & PASCALE, H. — Pesquisas sôbre a ancilostomose em São Paulo. III. Intensidade da ancilostomose em algumas fazendas de café no município de Ribeirão Prêto. Arq. Hig. & Saúde públ. **6**: 30-37, 1941.

39. PESSÔA, S. B. & PASCALE, H. — Pesquisas sôbre a ancilostomose nos escolares de vários municípios. Arq. Hig. & Saúde públ. **6**:66-71, 1941.

40. SETZER, J. — Contribuição para o estudo do clima do Estado de São Paulo. D.E.R., 1946.

41. SIOLI, H. — Estudo preliminar das relações entre a geologia e a limnologia da Zona Bragantina. Bol. técn. Inst. Agr. Norte (24):67-76, 1951.

42. SMILLIE, W. G. — Existência e disseminação do *Ancilostoma duodenale* no Brasil. Bol. Inst. Hig. São Paulo (7):1-9, 1922.

43. SMILLIE, W. G. — Studies on hookworm infection in Brazil, 1918-1920 (second paper). Monographs Rockefeller Inst. (17), 1922.

44. SORRE, M. — Les fondements de la géographie humaine: vol. I, Les fondements biologiques. Paris, Armand Colin, 1947.

45. VALVERDE, O. — Planalto meridional do Brasil. Rio de Janeiro, Conselho Nacional de Geografia, 1957.

Recebido para publicação em 20 abril 1961.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
3(4):209-212, julho-agôsto 1961

CDU 576.8.077

Notas de Técnica

"BATOQUES" DE POLIETILENO NO PREPARO DE PLACAS PARA HEMAGLUTINAÇÃO E FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

Elias V. Lemos MONTEIRO [1] e Octavio Augusto PEREIRA [1]

RESUMO

Os autores propõem a substituição das placas escavadas, usadas em reações de hemaglutinação ou de fixação do complemento, quando se destinam a trabalhos feitos em larga escala, por um dispositivo mais prático e mais econômico constituído por uma placa metálica perfurada e "batoques" de polietileno. Discutem as vantagens dessa modificação técnica.

INTRODUÇÃO

A introdução de micrométodos nos trabalhos realizados em larga escala no campo da sorologia consagrou, pelas facilidades e vantagens que êles apresentam, o emprêgo de placas escavadas em algumas reações de hemaglutinação e fixação do complemento. Seu emprêgo, entretanto, apresenta alguns inconvenientes por vêzes difíceis de serem contornados, como por exemplo: dificuldades na obtenção de placas adequadas, alto preço de alguns modelos e problemas de riscamento, oxidação e quebra de placas.

Construímos e temos utilizado um aparelho (Figs. 1 e 2) que, a nosso ver, sem apresentar os inconvenientes apontados, reúne certas vantagens sôbre os modelos de placas até hoje apresentados. Suas escavações são constituídas por "batoques" de polietileno empregados no comércio para vedação de frascos *. São montados em placa perfurada, preferentemente metálica, para maior facilidade de lavagem e esterilização. As perfurações são de tamanho tal, que permitem a colocação, sem pressão, e fácil retirada dos "batoques", ficando êstes, quando montados, apoiados apenas pela aba que possuem. Para evitar evaporação durante a incubação das reações, empregamos como cobertura uma placa de "plexiglas" ou de vidro plano.

A fotografia de reações (Fig. 3) foi obtida com auxílio de negatoscópio colocado em posição horizontal, sendo que os orifícios não utilizados foram vedados por tampas de borracha. Tal artifício foi empregado apenas para se ter uma documentação fotográfica satisfatória, sendo a leitura, entretanto, absolutamente nítida, simplesmente contra fundo claro. Está representada nesta fotografia uma reação de inibição de hemaglutinação, vendo-se de cima para baixo: a titulação do vírus, a reação contra o sôro homólogo e resultados obtidos com vários soros testados.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo — Instituto de Medicina Tropical de São Paulo — Departamento de Microbiologia e Imunologia (Diretor: Prof. Carlos da Silva Lacaz).

(1) Assistentes do Instituto de Medicina Tropical.

* Diversas fábricas produzem tais opérculos. Utilizamos "batoques" de polietileno nº 14,5 — "Plásticos Bahi S.A.", rua França Pinto, 260 — São Paulo.

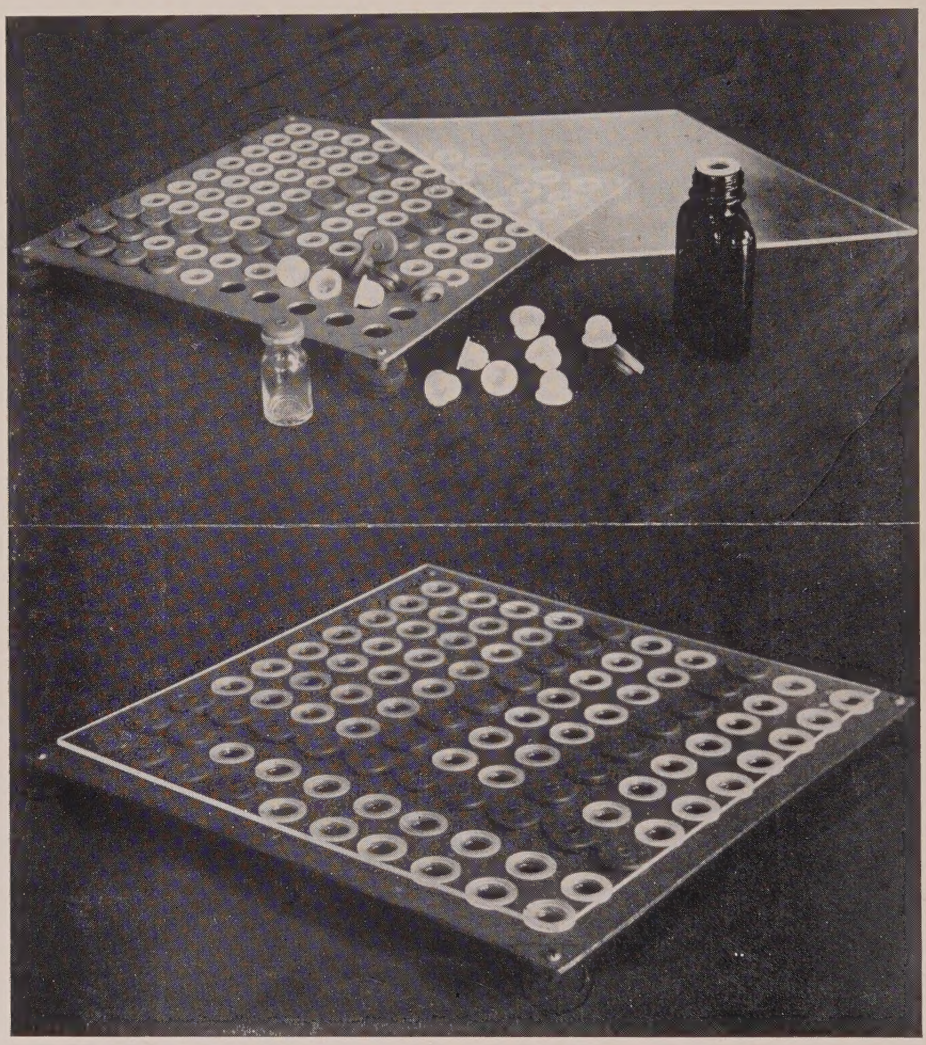


Fig. 1 e 2

Como outras características favoráveis, apresenta êste aparelho as seguintes:

1) A perfuração das placas pode ser projetada, para atender, quanto à disposição dos orifícios, às conveniências de cada modalidade de trabalho.

2) Dispondo-se de algumas placas perfuradas, os "batoques" podem ser substituídos de tal forma que não haja necessidade de paralisação dos trabalhos para desinfecção e lavagem das placas.

3) Os erros de pipetagem podem ser fàcilmente corrigidos pela simples substituição do "batoque".

4) Existem "batoques" de vários tamanhos, podendo-se escolhê-los de acôrdo com o volume total empregado em cada técnica; deve-se, apenas, ter o cuidado de selecionar "batoques" cujo fundo seja perfeitamente arredondado para evidenciação perfeita das reações negativas.

5) A despeito do que se poderia supor, tratando-se de polietileno, os "batoques" que empregamos não se deformaram

após fervura em água por várias horas; tal fato possibilita o emprêgo dêsse método de esterilização, quando são usados antígenos vivos.

6) Finalmente, convém lembrar o baixo custo do aparelho, especialmente tendo em vista que a placa perfurada poderá ser feita até de madeira.

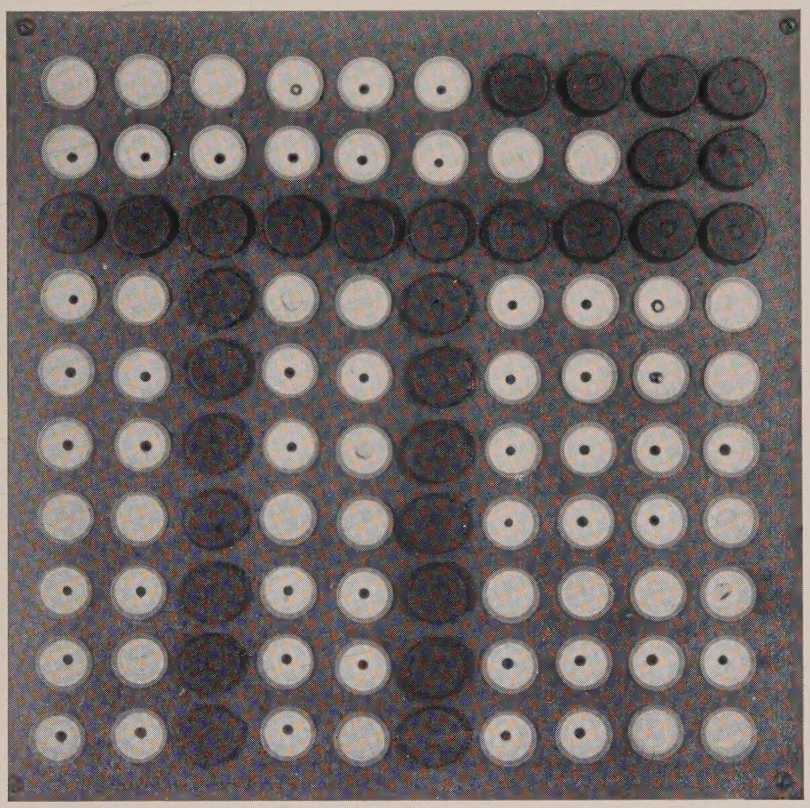


Fig. 3

SUMMARY

Polyethylene insert to prepare plates for hemagglutination and complement fixation test

A notable advance in serology has been the introduction of micromethods for hemagglutination and complement fixation tests, which greatly facilitate large-scale serological surveys. The use of trays with spherical cavities has shown practical difficulties as to how to obtain adequate trays, the high price of some models and problems of damage, oxidation and breakage of the plates.

We have built and we are using a model which, according to our point of view, is better than the models so far presented. Its spherical cavities are made up of polyethylene inserts used in drug glasses (Figs. 1-2). They are mounted in perforated trays, usually made up of metal, in order to facilitate cleaning and sterilization. Perforations are done in order that the polyethylene inserts are put in place without pressure. They stay in place supported by their borders. Evaporation during the reactions is prevented with a glass or plexiglas plate.

The picture of the reaction (Fig. 3) was obtained using a view-box placed in hori-

zontal position, the perfurations not used were closed with rubber plugs. This was employed in order to obtain a better picture. Reading of the reactions can be done easily against a clear background. An hemagglutination inhibition test is presented in this picture, and going from top to the bottom are to be seen: virus titration; reactions against homologous serum; and results obtained with different tested sera.

Other characteristics of this model are:

1 — The disposition of the trays' perforations can be adapted according to the convenience of each work.

2 — With only a few trays, the polyethylene inserts can be easily replaced in order not to interrupt the work for disinfection and cleaning of the plates.

3 — Mistakes are easily corrected through the polyethylene insert replacement.

4 — There are polyethylene inserts with different sizes and we can choose them up according to the total volume used in each technique; however we must be careful in selecting only inserts with rounded bottoms in order to see well the negative reactions.

5 — Polyethylene inserts are not damaged by boiling in water during many hours. This method of sterilization can be employed when alive antigens are used.

6 — The low price of the model here presented is also important to remember, especially considering that the perforated plates can be done in wood.

Recebido para publicação em 29 julho 1961.